

ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

FONDÉES SOUS LE PATRONAGE DE **L. PASTEUR**

PAR

E. DUCLAUX

ET CONTINUÉES PAR

E. ROUX (1904)

A. CALMETTE (1922)

COMITÉ DE DIRECTION

**Gak. BERTRAND, E. LECLAINCHE, L. MARTIN,
G. RAMON,**

assistés des Professeurs et Chefs de service de l'Institut Pasteur,

Secrétaire général : A. BOQUET.

TOME SOIXANTE-CINQUIÈME

Juillet-Décembre 1940

PARIS

MASSON ET C^{ie}, ÉDITEURS

LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

120, Boulevard Saint-Germain (6^e).

PARIS. — ANC^{re} IMP. DE LA COUR D'APPEL, 1, RUE CASSETTE. — 1940.

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

SUR L'ACTION HYPERGLYCÉMIANTE DES VENINS DE SERPENTS

par GABRIEL BERTRAND et RADU VLADESCO.

Dans un mémoire publié récemment, nous avons montré que le venin de *Naja tripudians* L., dit Cobra de capello ou Serpent à lunettes, renferme une substance déterminant chez le cobaye et chez le lapin une augmentation très marquée de la teneur du sang en glucose. Cette hyperglycémie augmente progressivement depuis le moment de l'inoculation du venin jusqu'à celui de la mort (1).

Nous nous sommes demandé si la substance hyperglycémiant, contenue dans le venin de Cobra, existe dans d'autres venins et, secondairement, s'il est possible de trouver dans l'étude comparative de divers venins des arguments susceptibles de différencier cette substance hyperglycémiant des substances actives déjà connues. Nous avons, en conséquence, examiné de nouveaux venins (16 espèces et 1 variété) provenant les uns de Colubridés, groupe de serpents auquel appartient le Cobra, les autres de Vipéridés, parmi lesquels se trouvent la Vipère aspic, le Crotale, etc.

Nous avons expérimenté tous ces venins sur le Cobaye, plus

(1) Ces *Annales*, 64, 1940, p. 344.

spécifique, semble-t-il, que le lapin à l'égard de la substance hyperglycémiante. Cet animal présente, d'autre part, l'avantage d'être moins coûteux et de ne nécessiter qu'une quantité plus petite de venin. En outre, pour ne pas sacrifier trop d'animaux, nous n'avons pas essayé de déterminer d'abord la stricte équivalence des doses des divers venins pouvant amener la mort dans les mêmes délais ; il nous a paru suffisant, du moins pour ce début d'enquête, d'essayer une première dose, supposée à peu près convenable d'après des résultats antérieurs, des indices tirés de la littérature scientifique ou de certaines analogies, et d'injecter une seconde dose, parfois même une troisième, un certain temps après la première, lorsque celle-ci ne provoquait pas assez rapidement les symptômes avant-coureurs d'une intoxication mortelle. Nous avons dû, cependant, avec certains venins, faire deux à trois expériences en modifiant les doses injectées.

Nous avons observé, au cours de nos précédentes recherches, que l'hyperglycémie apparaît plus nettement lorsque l'envenimation est rapide et entraîne la mort en quelques heures au plus, que lorsqu'elle permet une survie prolongée. Nous avons tenu compte de cette observation dans les expériences que nous rapportons aujourd'hui. C'est ainsi qu'avec certains venins, ceux de *Bungarus*, de *Naja flava*, de Vipère de Russell, de Vipère du Gabon et de Mocassin, dont les doses d'abord essayées ne laissaient pas apparaître d'augmentation de la teneur du sang en glucose, nous avons recommencé les expériences avec des doses plus fortes. Il était indispensable de savoir, en effet, si le venin examiné était dépourvu de toute action hyperglycémiante ou si, au contraire, celle-ci ne s'était pas manifestée parce que les conditions favorables à sa mise en évidence n'avaient pas été réalisées.

Ces remarques étant faites, voici la liste des nouvelles espèces dont nous avons examiné le venin et le tableau récapitulatif des résultats alors obtenus.

LISTE DES ESPÈCES EXAMINÉES.

Colubridés :

1. *Dendraspis angusticeps* (Mamba, de l'Afrique du Sud).
2. *Bungarus fasciatus* (Bungare, de l'Asie sud-orient.).
3. *Naja flava* (Cobra du Cap).
4. *Naja haje* (Aspic de Cléopâtre, Egypte).
5. *Sepedon haemachates* (Serpent cracheur ou Ringhal, Afrique du Sud).

Vipéridés :

6. *Vipera aspis* (Vipère aspic) a) variété à venin jaune ;
b) variété à venin blanc.
7. *Vipera lebetina* (Vipère des pays méditerranéens).
8. *Vipera russelli* (Vipère élégante ou Daboïa, des Indes).
9. *Bitis gabonensis* (Vipère du Gabon).
10. *Bitis arietans* (Vipère heurtante ou Puff-Adder, Afrique du Sud).
11. *Cerastes cornutus* (Vipère cornue, Afrique du Nord).
12. *Ancistrodon piscivorus* (Mocassin ou Copperhead, Amérique du Nord).
13. *Bothrops atrox* (Brésil).
14. *Lachesis gramineus* (Lachesis).
15. *Crotalus adamanteus* (Crotale ou Serpent à sonnettes, Amérique du Nord).
16. *Crotalus atrox* (Crotale ou Serpent à sonnettes, Amérique du Nord).

Nous devons faire observer que les résultats du tableau I ne doivent pas être considérés comme exprimant la mesure exacte de l'action exercée sur la glycémie du cobaye par les venins essayés ; ils apportent des arguments quant à l'existence et au sens de cette action, mais ils ne donnent, ainsi que cela se rencontre fréquemment dans l'étude des réactions physiologiques, qu'une idée plus ou moins approchée de la grandeur de cette action. Le taux de la glycémie est, en effet, très

TABLEAU I.

VENINS EXAMINÉS	POIDS du cobaye en grammes	VENIN SEC INJECTÉ en milligrammes	TEMPS ÉCOULÉ au moment		GLUCOSE par litre de sang		VARIATION de la glycémie p. 100
			de la nouvelle ponction en heures	de la mort en heures	avant l'injection en grammes	après l'injection en grammes	
1. <i>Dend. a.</i>	586	2,35	1	1,01	0,635	1,804	+ 175
2. <i>Bung. f.</i>	620	4,7 (1,7 + 3 après 2 heures).	2,45	3,40	0,744	0,744	0
	555	40,3	4,40	4,20	0,664	0,830	+ 25
3. <i>Naja f.</i>	540	3,7 (1,85 + 1,85 après 1 heure).	1,10	1,20	0,660	0,660	0
	620	43,0	0,40	0,40	0,680	1,360	+ 100
4. <i>Naja h.</i>	660	2 (1 + 1 après 2 h. 33).	4,43	0,40	0,964	4,345	+ 36
	660		3,43	3,43	0,964	2,454	+ 135
5. <i>Seped. h.</i>	610	2,25	1,30	4,47	0,920	1,254	+ 36
	610	2,25	1,47	4,47	1,420	4,420	+ 54
6. <i>Vip. a. a.</i>	556	3,4 (2,4 + 1,3 après 0 h. 30).	2,45	4	0,826	4,458	+ 70
6 bis. <i>Vip. a. b.</i>	535	3,45 (2,25 + 1,2 après 1 h. 20).	2,05	2,40	0,666	1,464	+ 75
7. <i>Vip. l.</i>	586	9,5	4,45	> 4	0,697	0,926	+ 33
	670	6,3	2	8,45	1,476	4,096	+ 7
8. <i>Vip. R.</i>	740	41	4,45	Survie.	1,792	4,680	- 6
	432	13 (11 + 2 après 1 h. 25).	4,55	2,05	0,710	1,212	+ 71
	500	14,0	2	4	0,938	4,792	+ 91
9. <i>Bit. g.</i>	520	40,0	1,50	> 4,45	1,546	4,466	- 5
	460	15,0	2,45	2,55	0,916	2,382	+ 160
10. <i>Bit. ar.</i>	805	4,5 (2,6 + 1,9 après 1 h. 30).	2	9	0,732	4,303	+ 78
11. <i>Cer. c.</i>	570	4,8 (3 + 1,8 après 1 h. 30).	2,30	> 4,30	0,676	1,950	+ 149
12. <i>Anc. p.</i>	614	6,2 (3,4 + 3,4 après 1 h. 45).	2,55	Survie.	0,900	0,859	+ 4,5
	575	17,0	1,40	> 9	0,831	1,682	- 102
13. <i>Bot. at.</i>	590	5 (1 + 2 après 4 h. 45 + 2,0 après 6 h. 34).	6,58	Survie.	1,008	1,053	+ 5
	590		8,30		4,008	1,328	+ 32
14. <i>Lach. g.</i>	585	7,6 (3,8 + 3,8 après 1 h. 45).	2,45	0,45	0,750	1,125	+ 80
	400	40,0	0,40	0,622	0,622	1,064	+ 71
15. <i>Crot. ad.</i>	365	3,7 (2 + 1,7 après 1 h. 30).	2,30	4	0,976	4,466	+ 50
	705	6,25	4,22	0,737	0,737	4,064	+ 44
16. <i>Crot. at.</i>	705	6,25	2,17	> 6,30	0,737	1,146	+ 56

variable, comme nous avons eu l'occasion de le constater au cours de nos expériences : il diffère non seulement d'un cobaye à un autre, mais il augmente ou diminue pour un même cobaye avec une grande facilité, et cela, sous des influences diverses et dont l'importance quantitative est presque individuelle.

Le taux de la glycémie du cobaye est, le plus souvent, compris entre 0 gr. 8 et 1 gr. 2 par litre, mais nous l'avons vu, chez des animaux qui paraissaient en bonne santé, descendre à 0 gr. 60 et même une fois à 0 gr. 52, atteindre, par contre, jusqu'à 1 gr. 8.

La ponction du ventricule, avec l'aiguille de la seringue de Pravaz lorsqu'on prélève du sang, suffit à modifier la glycémie d'une manière très sensible, non pas chez tous les animaux, mais chez la plupart.

Les expériences suivantes permettent d'apprécier cette modification ; elles ont été réalisées dans les mêmes conditions que les expériences consignées dans le tableau I, mais en remplaçant, chez la moitié des animaux, la solution de venin dans l'eau salée physiologique par de l'eau salée physiologique seule et, chez l'autre moitié, sans faire aucune injection.

Les résultats de ces expériences-témoins montrent que, sur 12 cobayes expérimentés, la ponction cardiaque est restée sans effet sur la glycémie dans 2 cas, qu'elle l'a élevée d'environ 6 à 12 p. 100 dans 8 cas, à 20 et même 23 p. 100 dans les 2 cas restants.

Ce n'est pas parce que, dans l'intervalle des deux ponctions, certains cobayes sont restés sans manger tandis que les autres ont absorbé de la nourriture, qu'il y a eu des résultats si différents : les cobayes injectés avec du venin ne mangeant pas, les témoins avaient été privés d'aliments pendant l'expérience. Ces témoins ont, par ailleurs, très bien supporté les ponctions, ils ont pu être conservés les jours suivants sans présenter aucun trouble visible.

Ainsi, d'après les expériences du tableau II, les prises de sang par ponction cardiaque ont provoqué chez la plupart des cobayes une certaine hyperglycémie. Comme celle-ci est incer-

TABLEAU II.

POIDS des cobayes	SOLUTION physiologique injectée (1) en cent. cube	INTERVALLE des deux ponctions en heures	GLUCOSE PAR LITRE en grammes		VARIATION de la glycémie p. 100
			1 ^{re} prise	2 ^e prise	
Après injection d'eau physiologique :					
592.	1,5	2,57	0,840	0,924	10
670.	1	2,42	0,823	0,905	9,9
680.	1	2,34	1,169	1,290	10,3
522.	1,3	3	0,811	0,811	0
815.	0,5	2,38	0,901	0,901	0
670.	0,25	2,45	0,949	1,138	19,9
Sans injection d'eau physiologique :					
635.		2,47	1,153	1,220	5,8
535.		2,44	0,742	0,791	6,6
620.		2,43	1,046	1,133	8,3
665.		2,34	0,887	0,968	9,1
745.		2,40	0,841	0,940	11,7
780.		2,43	1,088	0,841	22,7
(1) Cette solution a été injectée sous la peau de l'abdomen aussitôt après la première prise de sang.					

taine et diffère beaucoup d'intensité suivant les animaux, il n'est pas possible d'en tenir un compte exact, par simple soustraction, dans la mesure de l'action des venins. On doit seulement se rappeler son existence et n'admettre comme ayant une valeur positive, dans le cas des injections venimeuses, que les chiffres d'hyperglycémie nettement supérieurs à ceux qui ont été obtenus dans les expériences témoins.

Cette réserve étant faite, si nous nous reportons aux expériences du premier tableau, nous voyons qu'il a été facile de réaliser, avec tous les venins, soit dès la première dose essayée, soit, tenant compte des observations rappelées au commencement de ce mémoire, en augmentant un peu cette dose, des hyperglycémies nettement positives.

Le chiffre le plus bas a été celui de 25 p. 100 dans la seconde expérience avec le venin de *Bungarus fasciatus*. D'après l'allure générale des résultats que nous avons obtenus, ce chiffre aurait probablement été beaucoup dépassé par l'essai d'une dose plus forte dans une troisième expérience, mais

nous ne l'avons pas vérifié. Nous nous sommes contentés également des augmentations du taux de la glycémie de 32 et de 33 p. 100, réalisées dès la première expérience, avec les venins de *Bothrops atrox* et de *Vipera lebetina*, dont nous n'avions que de petites quantités. Avec les autres venins, les augmentations ont monté de 40 à près de 190 p. 100.

On est donc en droit d'étendre l'existence de la substance hyperglycémiante, signalée antérieurement dans le venin de *Cobra capello* et que nous appellerons pour simplifier « hyperglycémine », *à tous les venins que nous avons examinés*. Selon toute vraisemblance, il y a probablement là une règle applicable à l'ensemble des sécrétions venimeuses ophidiennes.

Cette conclusion n'est pas la seule que l'on puisse tirer de nos expériences.

L'hyperglycémine est présente dans les venins des Colubridés comme dans ceux des Vipéridés ; elle est même particulièrement abondante dans les venins de *Dendraspis* et de *Naja*. Elle ne saurait donc être confondue avec l'échidnase (2) dont la présence est pour ainsi dire caractéristique des venins de Vipéridés.

L'hyperglycémine se distingue presque aussi bien des substances neurotoxiques, si l'on en juge par la disproportion qui apparaît, lorsqu'on passe d'un venin à un autre, entre la dose léthale et l'activité sur la concentration du sucre sanguin.

Comparons-nous, par exemple, les expériences avec le venin blanc de *Vipera aspis* et le venin de *Vipera russelli*, dans lesquelles la mort a été provoquée en deux heures environ, nous voyons qu'il n'a fallu que 3 milligr. 5 du premier venin contre 13 à 14 du second pour obtenir ce résultat, alors que les augmentations de glycémie ont été à peu près les mêmes : 75 p. 100 avec *Vipera aspis*, 71 et 91 avec *Vipera russelli*.

L'hyperglycémine se distingue encore d'autres substances. Césari, Bauche et Paul Boquet ont rencontré dans le dépar-

(2) PHISALIX (C.) et BERTRAND (Gabriel). *C. R. Ac. Sc.*, **118**, 1894, p. 288 et p. 356, et *Arch. de Physiol.*, 5^e série, **6**, 1894, p. 567 et **7**, 1895, p. 260.

tement du Gers une variété physiologique de *Vipera aspis* dont la sécrétion venimeuse est à peu près incolore. Ayant étudié cette sécrétion, ce venin blanc, comparativement au venin jaune ordinaire, ils l'ont reconnu plus neurotoxique, par contre, moins nécrosant, moins hémolytique et moins actif sur la coagulation du sang (3). Un peu plus tard, Marie Phisalix a trouvé qu'il était dépourvu de pouvoir vaccinant (4). Les expériences que nous avons faites, montrant que l'action du venin blanc sur le taux de la glycémie est au moins aussi forte que celle du venin jaune, l'hyperglycémie doit être tenue comme différente de l'échidnovaccin (5).

La découverte de l'hyperglycémie, à côté des substances actives déjà reconnues dans les venins des serpents, mérite de retenir l'attention des chimistes, des physiologistes et des médecins sur le fait qu'une même glande peut sécréter à la fois toute une série de biocatalyseurs et que ceux-ci peuvent varier en proportion, les uns par rapport aux autres, suivant les espèces et dans une espèce suivant diverses circonstances.

(3) C. R. Ac. Sc., **201**, 1935, p. 683 et Ces Annales, **63**, 1939, p. 592.

(4) C. R. Ac. Sc., **208**, 1939, p. 1252.

(5) Substance immunisante ordinairement contenue dans le venin, d'après C. PHISALIX et Gabriel BERTRAND (C. R. Ac. Sc., **118**, 1894, p. 356 et Bull. Mus. Hist. Nat., **4**, 1895, p. 129). Rappelons ici que la découverte de l'existence et des propriétés du venin blanc corroborent et élargissent la portée des faits, déjà reconnus en 1895, au sujet des variations de virulence du venin de la Vipère; suivant les saisons et les localités, le venin de *Vipera aspis* varie dans sa composition quantitative et même qualitative. En avril, par exemple, il faut de deux à deux fois et demie plus de venin qu'en septembre pour déterminer la mort; d'autre part, deux variétés physiologiques ont été rencontrées, l'une à Arbois (Jura) et l'autre à Clermont-Ferrand (Puy-de-Dôme); le venin de la première ne renferme pas d'échidnase au printemps et ressemble alors à celui d'un Colubridé, celui de la seconde est dépourvu de propriété immunisante, il ne renferme pas d'échidnovaccin (C. Phisalix et Gabriel Bertrand, Arch. de Physiol., 5^e série, **7**, 1895, p. 260).

**LES PROPRIÉTÉS PATHOGÈNES
DES BACILLES TUBERCULEUX MORTS,
ENROBÉS DANS L'HUILE DE VASELINE
ET INJECTÉS PAR VOIE TESTICULAIRE**

**LEUR APPORT AUX NOTIONS DE SPÉCIFICITÉ ET DE VIRULENCE
DU BACILLE TUBERCULEUX**

par A. SAENZ et G. CANETTI.

*(Institut Pasteur. Laboratoires de recherches
sur la tuberculose.)*

Le regain de faveur actuel de l'étude des bacilles tuberculeux morts trouve son explication dans les résultats obtenus par la mise en œuvre d'un simple artifice de laboratoire, en l'espèce l'enrobage des bacilles dans l'huile de vaseline. Cette technique de l'enrobage huileux a ouvert la voie à des perspectives expérimentales tout à fait inattendues. Par des faits aujourd'hui certains, elle heurte au moins deux notions que l'on croyait, depuis de longues années, définitivement acquises.

En effet, s'il est admis depuis les recherches de A. Boquet et L. Nègre, de Petroff et Stewart, de A. Branch et J. R. Cuff, Crawford et d'autres encore, que les bacilles morts sont capables de rendre le cobaye sensible à la tuberculine, il n'en reste pas moins que les réactions allergiques ainsi produites sont irrégulières et fluctuantes et, surtout, n'atteignent jamais une intensité comparable à celle des réactions produites par les bacilles vivants et virulents.

Une autre notion non moins classique était celle résultant des travaux de Straus et Gamaleia. Ces auteurs, dès 1891, avaient constaté que le caractère fondamental de la lésion produite par les bacilles morts était d'être *strictement locale*, de n'être jamais suivie de généralisation comme la lésion locale provoquée par les bacilles tuberculeux vivants.

Or, ni l'une ni l'autre de ces notions — qui eurent force de loi pendant des années — ne peuvent à l'heure actuelle être maintenues.

Pour la *première* — allergie peu notable produite par les bacilles morts — l'opinion commença à évoluer lorsque, en 1934, Coulaud eut l'idée d'incorporer les bacilles tuberculeux morts dans de la paraffine bouillante et d'injecter cette émulsion bacillifère aux animaux d'expérience. Il fut alors frappé par l'intensité de l'état allergique ainsi déterminé. En 1935, l'un de nous obtint le même résultat en remplaçant la paraffine par l'huile de vaseline, substance liquide à la température ordinaire, ce qui simplifiait beaucoup la technique d'injection (1). La technique d'enrobage des bacilles morts dans l'huile de vaseline, ainsi que l'intensité de la sensibilité tuberculinique observée chez les cobayes inoculés, ont été longuement décrites par l'un de nous dans un mémoire antérieur, où se trouve également établie la notion d'un retard dans la dispersion d'une infection virulente évoluant chez les animaux ainsi rendus hyperallergiques, de même que celle d'une augmentation très notable de l'immunité.

Nos expériences furent confirmées par de nombreux chercheurs, tant en France qu'à l'étranger. En France, Noël Rist, qui consacra sa thèse à ce sujet, conclut que l'enrobage des bacilles morts dans l'huile de vaseline confère au cobaye une allergie précoce et durable, et une certaine résistance à une injection d'épreuve.

En Amérique, à la suite de nos travaux et par l'emploi de la même méthode, Freund, Casals et Hosmer réussirent à sensibiliser des lapins à la tuberculine avec des doses remarquablement faibles de bacilles morts en émulsion huileuse ; ils

(1) L'huile de vaseline avait déjà été employée par Le Moignic et Pinoy au cours d'essais de vaccination antityphique et dysentérique. Mais c'est Vallée qui, le premier, l'utilisa dans des expériences de vaccination contre la tuberculose avec des bacilles vivants ou, avec Carré et Rinjard, contre l'entérite hypertrophiante des bovidés. On connaît tout le parti que surent tirer Ramon et son école de l'emploi des substances grasses pour l'enrobage des toxines diphtérique ou tétanique. Tout dernièrement, Velu se servit des huiles minérales pour enrober des *Brucella melitensis*, voulant ainsi tenter la vaccination des bovidés.

mirent ensuite en évidence, chez ces animaux, un titre d'anticorps environ huit fois plus élevé que celui des témoins préparés avec des bacilles morts simplement émulsionnés dans l'eau. Toujours par les méthodes d'enrobage huileux, Casals et Freund arrivèrent à sensibiliser le derme du singe à la tuberculine.

En Allemagne, Hensel démontra l'importance de la résistance ainsi conférée à des cobayes contre une infection d'épreuve virulente. Enfin, tout dernièrement, Hæfliger, de l'Institut Robert Koch de Berlin, confirma l'état d'hypersensibilité présenté par les cobayes traités, le ralentissement de la dispersion bacillaire dans leur organisme et le degré d'immunité ainsi déterminé.

La deuxième donnée classique — absence de lésions métastatiques lors de l'injection de bacilles tuberculeux morts — était déjà sujette à caution depuis les expériences déjà anciennes de Korn, Tobler, Moeller et L. Rabinowitsch qui avaient montré que des bacilles acido-résistants saprophytes vivants, enrobés dans des excipients gras comme le beurre ou l'huile d'olive, donnaient naissance à des lésions éloignées du point d'inoculation, tandis que les mêmes germes en émulsion aqueuse ne déterminaient que des lésions localisées. Mais à l'époque, ces constatations n'éveillèrent pas le moindre intérêt. De même, les expériences de Bezançon et Philibert, qui démontrèrent, en 1928, l'accroissement du pouvoir pathogène des saprophytes acido-résistants par l'adjonction de beurre, demeurèrent sans écho.

Ce n'est vraiment que par les expériences de Thompson, Hagan et Levine, en 1932, que l'attention fut attirée sur un fait inattendu : l'apparition, lors de l'injection de bacilles morts, de lésions très à distance du lieu d'injection, lésions surtout pulmonaires qui étaient le résultat de la migration de la suspension bacillaire huileuse. Les auteurs américains furent les premiers à étudier ces lésions. Elles furent reproduites, surtout chez le cobaye, par Noël Rist, qui en fit une excellente étude macroscopique et microscopique.

Ainsi, les deux notions de l'impossibilité de conférer au cobaye par les bacilles morts une allergie comparable à celle donnée par les germes vivants, ainsi que de faire produire

aux bacilles morts des lésions métastatiques, étaient fortement battues en brèche par la nouvelle technique de l'enrobage huileux.

Nous consacrerons le présent mémoire à l'étude des lésions déterminées, chez le cobaye et le lapin, par les bacilles morts enrobés dans l'huile de vaseline, et *inoculés par voie testiculaire*. C'est que les lésions métastatiques produites par cette voie sont plus importantes que par toute autre. Et elles présentent des caractères si singuliers que de multiples problèmes s'en trouvent soulevés. Mais avant de les énumérer, voyons quelles sont ces lésions.

I. — LÉSIONS ANATOMIQUES PRODUITES CHEZ LE COBAYE PAR INOCULATION INTRATESTICULAIRE DE BACILLES MORTS ENROBÉS DANS L'HUILE DE VASELINE.

L'inoculation intratesticulaire étant une épreuve sévère, il convient d'employer des cobayes adultes, mâles, en bon état général, pesant de 400 à 600 grammes. La technique d'inoculation intratesticulaire est très aisée : il suffit de prendre soin de fixer, par une pression sur le bassin, le testicule amené à la surface des bourses. La quantité de liquide, ne devant pas dépasser 0 c. c. 5 à 1 cent. cube, est injectée doucement. On s'assure que l'on est bien dans le testicule, ce dont on s'aperçoit facilement par l'augmentation de volume de l'organe, qui fait saillie sous la peau.

Dans une première expérience, 11 cobayes reçoivent 1 centigramme de bacilles bovins, morts, desséchés et enrobés dans 1 cent. cube d'huile de vaseline suivant une technique déjà décrite par l'un de nous. En général, les animaux maigrissent rapidement, surtout pendant les trois premières semaines ; il n'est pas rare de constater qu'une certaine proportion en meurent, dans des délais variables.

Les lésions constatées à la table d'autopsie, chez les cobayes morts ou sacrifiés entre le trente-deuxième et le trois cent soixantième jour, sont les suivantes :

Le *testicule* inoculé est le plus souvent le siège d'un abcès allant de la taille d'un pois à celle d'une noix, rempli d'un pus crémeux et bien lié qui montre des formes acido-résis-

tantes en plus ou moins grande abondance. Le testicule opposé n'est pas atrophié.

Les *viscères abdominaux* peuvent présenter à leur surface quelques migrations en tache de bougie, qui prédominent généralement sur la face supérieure du foie et la face inférieure du diaphragme ; les reins et la rate peuvent en montrer également ; enfin, d'importants épaississements péritonéaux viennent rattacher plus ou moins solidement le foie et la rate au diaphragme, à l'estomac et surtout aux reins. Parfois, chez des cobayes inoculés depuis de longs mois, on peut trouver que ces lésions abdominales baignent dans un liquide ascitique, transparent et de couleur jaunâtre.

Mais l'attention est attirée par l'importance et la régularité des *atteintes pulmonaires* (10 sur nos 11 cobayes en présentent). Les poumons ne sont ni hypertrophiés, ni hémorragiques, mais ils sont le siège d'altérations notables. Il s'agit tantôt de granulations encore distinctes, tantôt, et plus souvent, de bandes infléchies, gris jaunâtre, d'aspect gélatineux et translucide, dessinant sur la surface du poumon un réseau dense et irrégulier, qui circonscrit dans ses mailles des îlots de parenchyme sain. Ces lésions prédominent très nettement à la face inférieure de l'organe et aux bords, où ils dessinent quelquefois une frange continue. Il n'y a pas d'hypertrophie des ganglions trachéo-bronchiques. Les lésions pulmonaires qui viennent d'être décrites sont en général pleinement constituées du trentième au soixantième jour et elles persistent inchangées pendant deux à quatre mois, parfois davantage. Nous donnons ci-dessous le détail des atteintes pulmonaires observées chez nos 11 cobayes :

- N° A. 66. — Mort le dixième mois. Métastases pulmonaires très importantes.
- N° A. 68. — Mort le trente-deuxième jour. Granulie pulmonaire massive.
- N° A. 69. — Mort le trente-quatrième jour. Hépatisation des deux lobes antérieurs.
- N° A. 70. — Mort le trente-deuxième jour. Hépatisation grise du lobe supérieur gauche.
- N° A. 44. — Mort le cent vingtième jour. Quelques points caséifiés dans les poumons.
- N° A. 10. — Mort le septième mois. Quelques granulations pulmonaires.
- N° A. 12. — Mort le cent quatre-vingt-quinzième jour. Migrations pulmonaires discrètes.

- N° A. 13. — Mort le cent trente-cinquième jour. Granulations pulmonaires.
 N° A. 14. — Sacrifié le cent soixante-cinquième jour. Granulations pulmonaires.
 N° C. 28. — Sacrifié le douzième mois. Quelques granulations en voie de guérison.
 N° C. 34. — Mort le quarantième jour. Pas de migration pulmonaire.

Comme on le voit, à partir du deuxième mois, ces lésions ont une tendance nette à la guérison ; tardivement, on

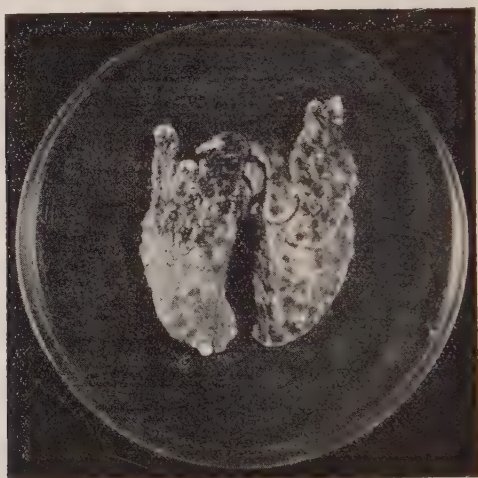


FIG. 1. — Migrations pulmonaires observées chez le cobaye préparé par voie intratesticulaire avec des bacilles morts enrobés dans l'huile de vaseline (face dorsale).

n'observe plus que des nodules en nombre restreint, qui vont se raréfiant à mesure qu'on s'éloigne de la date d'inoculation (cobayes A. 10, A. 12) ; cependant, et c'est le cas pour le cobaye A. 66, après de longs délais, dix mois, des lésions très importantes subsistent encore quelquefois.

Les figures n° 1 et n° 2 montrent un poumon avec les lésions typiques que nous venons de décrire.

A l'étendue notable de cette prise pulmonaire, s'oppose, d'une manière saisissante, l'absence d'atteinte des poumons chez les animaux témoins. 12 cobayes recevant, par voie intratesticulaire, la même dose de bacilles morts en suspension

aqueuse, ne montrent pas de lésions macroscopiques du poumon, bien que leur testicule soit transformé en un magma caséux ; quant aux animaux recevant la suspension bacillifère huileuse par voie sous-cutanée, ils ne présentent que des granulations de volume et de densité faibles, bien différentes des lésions importantes en bande décrites ci-dessus.

Dans une deuxième expérience, 10 cobayes reçurent, dans

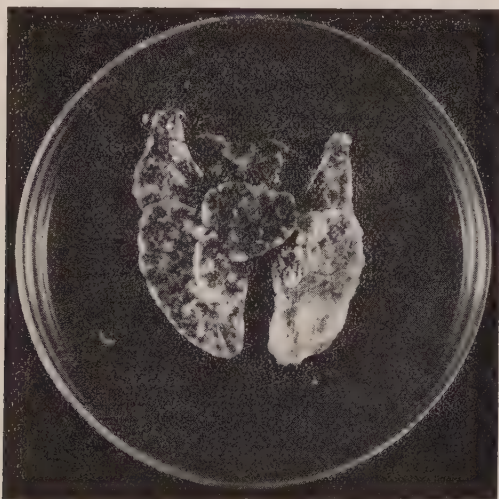


FIG. 2. — Même poumon, face ventrale.

les mêmes conditions d'enrobage huileux et d'injection intratesticulaire, des bacilles humains morts ; le tableau clinique et les lésions anatomiques furent similaires à ceux observés avec les bacilles bovins.

Signalons qu'en ce qui concerne la dose à injecter, 0 centigr. 5 de germes en suspension dans 0 c. c. 5 d'huile de vaseline donnent encore des migrations pulmonaires très importantes, mais avec une régularité moindre, et 1/10 de centigramme enrobé dans 1/10 de centimètre cube d'huile ne détermine plus que des métastases insignifiantes. La dose optima se révèle donc être de 1 centigramme de bacilles émulsionnés dans 0 c. c. 5 à 1 cent. cube d'huile.

Tels sont les faits observés chez le cobaye.

II. — LÉSIONS ANATOMIQUES PRODUITES CHEZ LE LAPIN PAR INOCULATION INTRATESTICULAIRE DE BACILLES TUBERCULEUX MORTS, ENROBÉS DANS L'HUILE DE VASELINE. DIFFÉRENCES DES LÉSIONS PULMONAIRES SELON LE TYPE DE BACILLES INJECTÉ.

Nous en arrivons aux lésions pulmonaires produites chez le *lapin* par la même méthode d'injection intratesticulaire des bacilles morts huileux. Aussi bien par leur constance que par leur gravité, ces lésions dépassent en intérêt de beaucoup celles qui viennent d'être décrites chez le cobaye. C'est en effet par elles que l'on arrive à la singulière notion de la *spécificité résiduelle* des différents types de bacilles tuberculeux morts.

TECHNIQUE. — Les bacilles, cultivés en voile sur Sauton, à 38°, pendant huit à dix semaines, tués par chauffage à 120°, lavés, essorés et séchés (2), étaient inoculés à la dose de 10 ou 20 milligrammes, après enrobage dans 1 cent. cube d'huile de vaseline. L'inoculation au lapin était faite dans le testicule préalablement amené au fond des bourses. Les animaux morts spontanément étaient sacrifiés après des délais variables, entre le trentième et le cent dixième jour. Le nombre de lapins fut de 19 pour le bacille bovin et de 10 pour le bacille humain ; en outre, deux groupes de témoins étaient constitués pour le bacille bovin, les uns inoculés avec la même suspension huileuse, mais par voie sous-cutanée ; les autres inoculés par voie intratesticulaire avec la même dose bacillaire, mais en suspension aqueuse.

Résultats des inoculations pratiquées avec le bacille bovin.

— Dans le tableau ci-dessous, nous résumons les effets de l'inoculation intratesticulaire de 4 souches bovines à 19 lapins, morts ou sacrifiés dans les délais indiqués, en nous limitant à décrire les seules atteintes pulmonaires :

(2) Il sied d'attirer l'attention sur ce point de technique. Nous travaillons, en effet, avec des bacilles secs et pulvérisés qui représentent, on le sait bien, cinq à six fois plus de germes que la même quantité prise à l'état humide, non essorée.

NUMERO	SURVIE	LÉSIONS PULMONAIRES
<i>Souche bovine S4 :</i>		
D. 5	Mort 48 jours.	Broncho-pneumonie caséreuse bilatérale massive.
D. 3	Sacrifié 42 jours.	Poumons hypertrophiés et hémorragiques; lésions nodulaires très importantes.
D. 1	Mort 39 jours.	Broncho-pneumonie généralisée.
D. 2	Sacrifié 55 jours.	Hypertrophie pulmonaire. Lésions hémorragiques et caséuses importantes.
<i>Souche bovine S2 :</i>		
D. 9	Mort 34 jours.	Broncho-pneumonie caséreuse bilatérale massive.
D. 16	Mort 63 jours.	Hypertrophie pulmonaire. Lésions hémorragiques et caséuses.
D. 3	Sacrifié 44 jours.	Hypertrophie pulmonaire. Broncho-pneumonie caséreuse bilatérale massive.
C. 4	Mort 3 mois.	Lésions pulmonaires très importantes. Hémoculture négative. Rares bacilles acido-résistants au frottis.
<i>Souche bovine V :</i>		
A. 71	Mort 50 jours.	Broncho-pneumonie caséreuse bilatérale massive.
A. 62	Mort 24 jours.	Broncho-pneumonie caséreuse massive. Dans un lobe, lésions de pasteurellose.
A. 67	Mort 58 jours.	Broncho-pneumonie caséreuse bilatérale massive. Hémoculture négative. Quelques bacilles acido-résistants, mais pas de flore secondaire au frottis.
A. 64	Sacrifié 58 jours.	Broncho-pneumonie très importante. Hémoculture négative. Pas de formes acido-résistantes ni de flore secondaire au frottis.
A. 83	Sacrifié 67 jours.	Quelques granulations dans les poumons d'aspect normal.
D. 8	Mort 47 jours.	Lésions pulmonaires étendues.
D. 11	Mort 53 jours.	Broncho-pneumonie caséreuse bilatérale massive.
A. 9	Sacrifié 3 mois 1/2.	Broncho-pneumonie caséreuse avec hypertrophie pulmonaire.
C. 33	Mort 31 jours.	Fonte caséreuse massive des deux poumons.
<i>Souche bovine R :</i>		
D. 89	Mort 31 jours.	Broncho-pneumonie bilatérale massive.
52. 71	Mort 35 jours.	Broncho-pneumonie bilatérale massive.

Comme on le voit, les lapins inoculés par voie intratesticulaire avec la suspension huileuse de bacilles bovins, meurent souvent spontanément entre le trentième et le soixantième jour. Au cours d'autres expériences, nous avons pu nous rendre compte que les migrations commencent à paraître entre le dixième et le quinzième jour, mais c'est à partir du vingt-cinquième que l'on observe habituellement le tableau caractéristique qui ne fait que progresser par la suite. Le testicule inoculé, très hypertrophié et allongé en saucisse, est transformé en un volumineux abcès rempli d'un pus crémeux et bien lié. Une partie de la suspension huileuse, ayant parfois

fusé dans la cavité péritonéale, a déterminé la formation de lésions d'ordre mécanique, en taches de bougie, sur le foie, la rate et les reins. Mais ce sont les lésions pulmonaires (voir fig. 3 et 4), celles-là dues à de véritables migrations lymphatiques et sanguines, qui prédominent. Les deux poumons

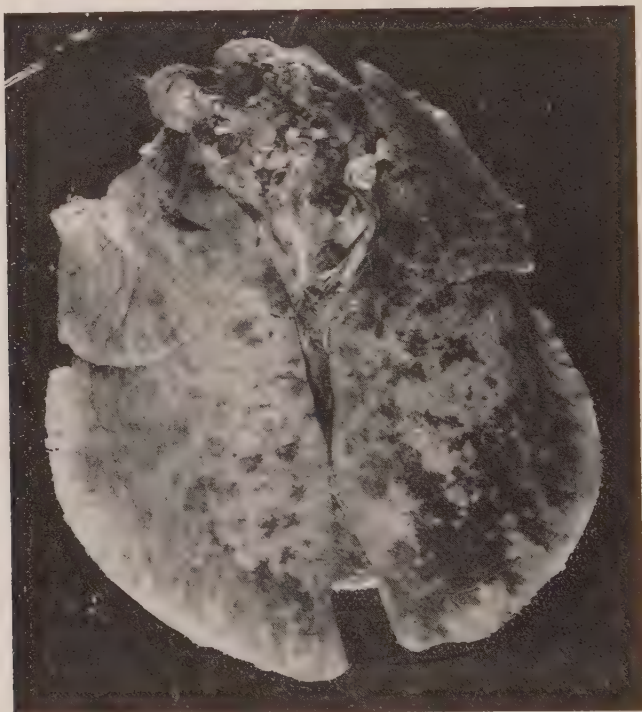


FIG. 3. — Lésions typiques observées chez le lapin inoculé par voie intratesticulaire avec des bacilles bovins morts enrobés dans l'huile de vaseline. (Cliché P. Jeantet.)

sont constamment atteints d'une hypertrophie parfois énorme, pouvant doubler, tripler leur volume ou même l'augmenter davantage. D'autre part, ils présentent le plus souvent de vastes zones de caséification confluant ici en énormes masses de nécrose homogène, ponctuées là par de petites plages hémorragiques. La nécrose peut n'atteindre qu'une partie du poumon ou se disposer en îlots, le reste de l'organe étant

fortement hémorragique ; souvent aussi, la presque totalité du poumon est caséifiée. C'est alors le tableau d'une pneumonie caséuse bilatérale et massive. Les trois processus d'hypertrophie, de nécrose caséuse et d'infiltration hémorragique coexistent toujours, en s'intriquant de manière variable

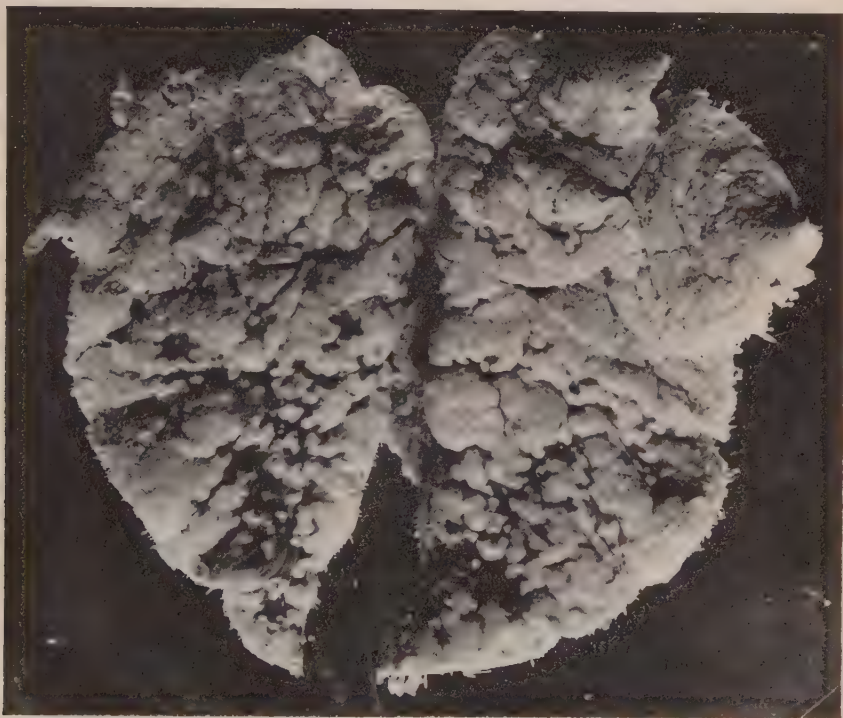


FIG. 4. — Autre aspect de migrations pulmonaires chez un lapin ayant reçu des bacilles bovins morts, enrobés dans l'huile de vaseline, par voie intratesticulaire. (Cliché P. Jeantet.).

selon les cas. Et cet ensemble lésionnel est bien dû aux bacilles enrobés et non à une infection surajoutée, l'hémoculture et les frottis d'organes, pratiqués à maintes reprises, étant demeurés négatifs.

Histologiquement, on note l'absence presque complète d'alvéoles sains ; par contre, l'existence de multiples et énormes plages de nécrose caséuse dont la structure alvéo-

laire est méconnaissable, plages séparées les unes des autres par d'étroites bandes d'alvéolite desquamative en voie de nécrose, par des trousseaux de sclérose commençante ou par des zones de réaction périfocale hémorragique.

Aucun des témoins ne présente de lésions pulmonaires comparables à celles-là. Les 6 lapins ayant reçu, par voie intratesticulaire, une suspension *aqueuse* de la même dose de bacilles bovins, montrent juste un petit abcès du testicule et, par ailleurs, une absence totale de lésions du poumon. Quant aux 6 lapins inoculés avec la suspension bovine huileuse, par *voie sous-cutanée*, ils présentent, outre un énorme abcès local atteignant le volume d'une mandarine ou d'une orange, soit une absence presque totale de lésions macroscopiques du poumon, soit de rares et exiguës granulations.

Il était intéressant de comparer à ces lésions pulmonaires considérables produites par le bacille bovin celles produites par le bacille *humain*, inoculé dans des conditions identiques.

RÉSULTATS DES INOCULATIONS PRATIQUÉES AVEC LE BACILLE HUMAIN. — A une exception près (1 lapin mort au vingt-septième jour), aucun des 10 lapins inoculés par voie intratesticulaire avec la suspension huileuse de bacilles humains morts, provenant de deux souches différentes, ne mourut dans les délais si souvent rencontrés pour le bacille bovin. Le tableau habituellement observé fut le suivant, les animaux ayant été sacrifiés aux cinquantième, soixantième, soixante-dixième, quatre-vingt-dixième et cent dixième jours : mêmes lésions testiculaires, mêmes rares fusées péritonéales, hépatiques et spléniques ; par contre, énorme différence quant aux lésions pulmonaires. L'hypertrophie est des plus modérées ou absente ; les organes flottent sur l'eau ; il y a peu ou pas d'injection hémorragique ; surtout, les zones pneumoniques sont beaucoup moins étendues, se disposant soit en îlots irréguliers d'étendue moyenne, soit plus souvent en bandes blanchâtres, irrégulièrement infléchies qui prédominent à la surface de l'organe et peuvent lui donner un aspect vaguement cérébroïde. Ces résultats sont tellement nets que nous avons jugé inutile de les relever dans un tableau comme nous avons fait pour le bacille bovin.

Histologiquement, il y a de vastes étendues d'alvéoles sains ; les quelques zones malades sont constituées par des plages d'alvéolite desquamative à grosses cellules claires ; les caséifications sont rares et très circonscrites ; la sclérose est limitée et l'inflammation périfocale est absente.

Il y a donc, à dose bacillaire, suspension huileuse et voie d'inoculation identiques, de notables différences entre les lésions pulmonaires produites par le bacille bovin mort et celles produites par le bacille humain mort (3). Les unes sont énormes, caséifiées de manière massive, entourées d'infiltration hémorragique et souvent rapidement mortelles ; les autres sont beaucoup plus petites, très peu nécrotiques, exemptes d'infiltration hémorragique et habituellement non mortelles. L'enrobage dans l'huile de vaseline suivi de l'injection intratesticulaire — conditions toutes deux indispensables — font donc apparaître, entre les bacilles bovin et humain morts, des différences de pouvoir pathogène nettement comparables, au moins quantitativement, à celles existant entre ces mêmes variétés de germes à l'état vivant.

Cette première série d'expériences fut suivie de plusieurs autres, où l'on observa avec la même constance le phénomène de la *dissemblance des lésions pulmonaires* selon la variété de bacilles morts injectés.

Il s'imposait dès lors de se demander ce que donnerait, injecté dans des conditions identiques, le bacille aviaire mort. Sans entrer dans de longues relations de protocole, disons que l'action pathogène du bacille aviaire mort se situe entre celle du bacille bovin mort et celle du bacille humain mort. Les lapins recevant l'injection intratesticulaire de bacilles aviaires morts huileux meurent fréquemment en un à deux mois : leurs poumons ne présentent qu'une hypertrophie moyenne, mais sont très hémorragiques et criblés de foyers généralement granuliques. Ces lésions s'obtiennent aussi bien avec la variante R qu'avec la variante S du bacille aviaire.

Dès ce moment, au problème premier de *l'activité patho-*

(3) Des photographies de poumons de lapins représentant les différents aspects de ces lésions ont été récemment publiées par l'un de nous, dans un travail consacré à l'étude de la virulence du bacille de Koch.

gène générale, des bacilles tuberculeux morts enrobés dans l'huile, s'en était ajouté un autre, de portée bien plus grande, celui de la *spécificité résiduelle* des bacilles tuberculeux morts. L'un et l'autre problème appelaient — et appellent encore — de très nombreuses investigations. Pour pénétrer plus avant dans le mécanisme d'action de l'enrobage huileux, il était de toute évidence nécessaire, entre autres, d'injecter séparément bacille et huile, et de voir quelles lésions en résulteraient. Pour asseoir sur des bases solides la notion de spécificité résiduelle des bacilles tuberculeux morts, et aussi pour connaître en quoi se superposent et en quoi se distinguent les notions d'activité pathogène du bacille tuberculeux mort et de virulence du bacille tuberculeux vivant, il s'imposait d'étudier, toujours par le même procédé d'enrobage huileux et d'injection intratesticulaire, les effets pathogènes de bacilles morts *provenant de souches atténuées*, ceux de bacilles *atténués vivants*, ceux enfin de bacilles *vivants et virulents*. De cet ensemble de recherches se sont dégagés quelques éclaircissements sur le mode d'action de l'huile, quelques données nouvelles aussi sur les notions de virulence et de spécificité du bacille tuberculeux. Nous le développerons après avoir montré ce que chaque groupe d'expériences a donné.

III. — INJECTION SÉPARÉE DE BACILLES TUBERCULEUX MORTS ET D'HUILE DE VASELINE.

Les premières expériences d'injection séparée des deux agents ont été réalisées par R. Laporte. En inoculant à des cobayes ou à des lapins, d'une part de l'huile de paraffine par voie trachéale ou péritonéale, d'autre part des bacilles paratuberculeux vivants, des bacilles humains vivants ou des bacilles aviaires morts par voie intraveineuse, Laporte obtient de grosses lésions pulmonaires lorsque l'injection huileuse est trachéale, pulmonaires et péritonéales lorsqu'elle est péritonéale, et les obtient même si l'injection bacillaire a été de quinze jours postérieure à l'injection d'huile.

Nous avons réalisé de pareilles expériences sur le lapin, avec des bacilles tuberculeux morts, en faisant varier de différentes manières les conditions de séparation des deux agents

1° INJECTION SÉPARÉE DANS L'ESPACE. — Le problème étant avant tout de savoir si l'intime brassage préalable est nécessaire pour qu'apparaisse le haut pouvoir pathogène du mélange, il fallait, pour commencer, introduire les deux agents à la fois séparément et directement dans le poumon. C'est ce qui fut fait par l'instillation intranasale ou trachéale de 2 cent. cubes d'huile de vaseline et l'injection intraveineuse simultanée de 20 centigrammes de bacilles bovins morts à 3 lapins. Alors que deux témoins inoculés avec la seule huile de vaseline ne présentaient pas trace d'altérations macroscopiques du poumon, que quatre autres, sacrifiés entre le quarantième et le soixantième jour, n'ayant reçu que des bacilles morts intraveineux n'avaient dans leurs poumons que des lésions pulmonaires peu importantes, les 3 lapins d'expérience moururent entre le vingt-cinquième et le cinquantième jour avec d'énormes lésions de broncho-pneumonie tuberculeuse massive. Et même en ramenant la dose bacillaire à 10 milligrammes injectés à 3 lapins, les lésions broncho-pneumoniques ou granuliques étaient, sauf dans 1 cas, considérables. Ainsi, il suffit que la rencontre des bacilles et de l'huile s'opère dans le poumon — elle s'y produit vraisemblablement à l'intérieur des mêmes éléments phagocytaires — pour qu'un haut pouvoir pathogène s'en trouve réalisé.

En introduisant maintenant l'huile de vaseline — 1 ou 2 cent. cubes dans le *péritoine* ou dans le *testicule*, les bacilles bovins morts (20 milligrammes) étant toujours simultanément injectés par voie intraveineuse, il devenait possible de voir, d'une part, s'il y a fixation des bacilles au lieu d'injection de l'huile lorsque ce lieu n'est pas le poumon, d'autre part, si la migration vers le poumon de cette huile injectée à distance est suffisante pour que, les bacilles morts se greffant sur elle, de grosses lésions pulmonaires puissent en résulter. Voici ce que nous avons observé. Des 4 lapins ayant reçu, outre l'injection bovine intraveineuse, l'huile de vaseline dans le *testicule*, 3 moururent en moins de quarante jours avec d'assez importantes lésions broncho-pneumoniques, à peine moindres que celles vues précédemment : au testicule, par contre, la lésion locale ne fut pas plus importante que celle habituellement donnée par l'huile *seule*. Le quatrième animal, sacrifié au

quatre-vingt-sixième jour, ne montrait dans ses poumons que des lésions insignifiantes. Quant aux 4 lapins ayant reçu, toujours en même temps que des bacilles bovins par voie intraveineuse, de l'huile de vaseline dans le *péritoine*, ils moururent tous en moins de deux mois, 3 d'entre eux présentant d'énormes lésions broncho-pneumoniques, mais point de lésions péritonéales ou viscéro-abdominales ; le quatrième, montrant par contre une atteinte pulmonaire moindre (granulie sans hypertrophie), mais des lésions en tache de suif sur foie, rate et diaphragme.

Ainsi, dans les conditions d'expérience où nous nous sommes placés, ni l'huile intratesticulaire, ni l'huile intrapéritonéale n'arrivent, d'une manière habituelle, à fixer là où elles se trouvent les bacilles morts simultanément injectés. Il apparaît donc par contre clairement que les migrations *pulmonaires* de l'huile sont, dans l'un et l'autre cas, suffisantes pour qu'avec l'arrivée des bacilles, de grosses atteintes broncho-pneumoniques en résultent presque constamment. Quant à expliquer la prédominance *pulmonaire* des lésions, quel que soit le mode d'injection de l'huile, elle relève sans doute d'un arrêt pulmonaire presque intégral des corps bacillaires introduits dans le torrent circulatoire. N'oublions pas en effet que c'est le réseau capillaire du poumon que les bacilles injectés par voie intraveineuse atteignent en premier lieu, et qu'il y a peu de chances pour que de très grandes quantités de bacilles puissent le traverser sans arrêt et atteindre ainsi la grande circulation. Voilà pourquoi de petites quantités d'huile migrées dans le poumon sont autrement déterminantes, pour l'apparition des lésions, que ne le sont d'énormes quantités d'huile présentes dans n'importe quelle autre partie du corps.

2° INJECTION SÉPARÉE DANS L'ESPACE ET DANS LE TEMPS. — Qu'allait-on observer en séparant l'injection des deux agents non seulement dans l'espace mais aussi dans le temps ?

En introduisant d'abord l'huile (toujours 2 cent. cubes par voie trachéale ou nasale), on voit ceci : Un premier lapin recevant les bacilles dix jours après l'instillation d'huile, et sacrifié quarante jours plus tard, ne montra pas trace de lésions pulmonaires. Mais 2 lapins reçoivent, *quinze jours* après l'ins-

tillation d'huile, une injection intraveineuse de 20 milligrammes de bacilles bovins morts : l'un d'entre eux, mort dix-sept jours plus tard, présente des lésions broncho-pneumoniques commençantes, l'autre, mort deux mois après l'inoculation bacillaire, est porteur de caséifications pulmonaires très étendues. Un autre animal reçoit l'injection bacillaire *vingt jours* après l'injection huileuse : sacrifié trois mois plus tard, il présente des lésions de broncho-pneumonie généralisées étendues. Dernier délai étudié, 2 animaux reçoivent l'injection bacillaire *trente jours* après l'instillation d'huile : l'un d'eux, mort un mois plus tard, montre des lésions de broncho-pneumonie très étendues ; l'autre, mort quarante-cinq jours plus tard, présente les mêmes lésions caséuses, auxquelles se surajoutent celles d'une pneumococcie.

On voit donc que les injections bacillaires *postérieures* aux instillations d'huile sont parfaitement opérantes, qu'elles produisent des lésions aussi graves et aussi spécifiques que celles données par l'injection simultanée, étudiée précédemment. De toute évidence — au moins pendant le délai de trente jours que nos expériences n'ont pas dépassé —, l'huile n'est pas éliminée du poumon, mais reste sur place, prête à capter les cadavres bacillaires introduits dans le torrent circulatoire : l'association huile-bacilles ainsi formée étant tout aussi pathogène que celle directement créée par brassage dans un mortier.

Ces faits que les inoculations séparées de bacilles et d'huile ont permis de mettre en évidence, nous serviront lors de l'étude du mécanisme d'action de l'huile de vaseline.

IV. — INJECTION INTRATESTICULAIRE DE BCG MORT ENROBÉ DANS L'HUILE DE VASELINE.

Devant les curieuses différences d'activité pathogène relevées entre les différents types de cadavres bacillaires, il était naturel de se demander ce que donneraient, dans les mêmes conditions d'enrobage huileux et d'injection intratesticulaire, des bacilles morts *provenant de souches atténuées*. La diminution de virulence allait-elle se poursuivre en une diminution des effets pathogènes à l'état mort ?

Laissant de côté nos expériences sur les souches humaines

et aviaires atténuées, expériences encore incomplètes, nous insisterons sur ce que le BCG nous a permis d'observer. Le nombre de lapins inoculés fut de 8 et la dose inoculée dans le testicule, chaque fois de 10 milligrammes de BCG morts, enrobés dans 1 cent. cube d'huile de vaseline. Un animal, mort le vingt-septième jour, ne présentait rien dans les poumons, mais l'abcès local, juxtatesticulaire et non testiculaire, montrait que l'injection avait passé à côté. Trois animaux moururent respectivement les trente-quatrième, quarante-sixième et cinquante et unième jours et 3 furent sacrifiés les vingtième, trente-troisième et quatre-vingtième jours. Il y avait à l'autopsie un abcès testiculaire d'importance moyenne, inconstamment des lésions en taches de bougie sur foie, rate, diaphragme et péritoine, enfin des atteintes pulmonaires constantes, d'un type assez particulier. L'hypertrophie de l'organe était assez considérable ; des lésions granuleuses, en taches, en bandes, en foyers conglomérés le parsemaient, mais ce n'étaient pas les caséifications massives habituellement observées avec les bacilles bovins morts de provenance virulente ; et de même, l'injection hémorragique était bien moindre. Quant au dernier animal d'expérience, il fut sacrifié le soixante-dix-huitième jour sans lésions pulmonaires appréciables.

Ainsi, l'activité pathogène du BCG mort n'est pas exactement celle de bacilles bovins morts de provenance virulente. La mort des animaux est un peu moins précoce, d'ailleurs inconstante ; les lésions pulmonaires sont moins prononcées, comportant moins d'hypertrophie, moins d'injection hémorragique, des foyers moins denses et moins confluent, et ces lésions, il arrive que l'un ou l'autre animal inoculé ne les présente pas. Néanmoins, bien plus que par les nuances les distinguant des atteintes par bacilles bovins de provenance virulente, ces lésions frappent par leur grande gravité, en regard surtout de l'insignifiance de celles produites par le BCG à l'état vivant. Lésions suffisamment graves pour que la majorité de nos lapins d'expérience en fussent emportés. Lésions bien plus graves aussi que celles produites dans les mêmes conditions par des bacilles *humains* morts, même issus de la souche la plus virulente ! Ainsi, un germe aussi totalement

avirulent que le BCG vivant vient se révéler, à l'état mort et dans certaines conditions d'expérience, porteur d'un pouvoir pathogène résiduel des plus marqués.

L'enseignement qui résulte d'un fait aussi singulier est double. Puisque, en effet, seules les propriétés chimiques et physico-chimiques des constituants bacillaires peuvent être en cause dans ces activités pathogènes de bacilles morts, et que l'activité du BCG mort n'est pas de beaucoup inférieure à celle de bacilles bovins morts issus de souches virulentes, *il ressort clairement que l'atténuation de virulence d'un bacille tuberculeux ne va pas nécessairement de pair avec une modification extrêmement profonde de sa constitution chimique et physico-chimique*. Qu'une certaine détérioration du corps bacillaire se soit produite, la chose n'est pas douteuse pour le BCG, puisqu'il est tout de même, à l'état mort, un peu moins pathogène qu'un bacille bovin mort de provenance virulente ; mais de combien cette détérioration du constituant bacillaire reste inférieure à la diminution de virulence observée sur le bacille vivant ! Il résulte de là, deuxième conclusion évidente, *que l'atténuation de virulence du BCG vivant doit surtout consister en une inhibition de son pullulement au sein des tissus où il se trouve porté*.

Il était d'ailleurs facile de vérifier par des expériences directes le bien-fondé de cette manière de voir. Si, en effet, il y avait pour le BCG vivant existence d'un pullulement très notable, on devrait, en l'introduisant chez le lapin par la même voie intratesticulaire et dans le même enrobage huileux, obtenir des lésions comparables aux précédentes *en employant des doses de bacilles bien moindres*, et des lésions plus prononcées, en employant des doses égales ou plus fortes. Il s'imposait donc d'étudier dans les mêmes conditions d'expérience le BCG vivant.

V. — INJECTION INTRATESTICULAIRE APRÈS ENROBAGE HUILEUX, DE BCG VIVANT, DE BACILLES HUMAINS VIVANTS ET VIRULENTS, DE BACILLES BOVINS VIVANTS ET VIRULENTS.

Les expériences entreprises avec le BCG vivant furent absolument concluantes. Deux lapins reçurent dans le testicule

1/10 de milligramme de BCG vivant, donc cent fois moins que la dose de BCG mort précédemment employée, enrobée dans 1 cent. cube d'huile de vaseline. Les animaux ne présentèrent nul trouble et, sacrifiés de longs mois plus tard, ne montrèrent ni lésions pulmonaires, ni migrations abdominales, ni même abcès testiculaire notable. Deux lapins reçurent dans les mêmes conditions 1 milligramme de BCG vivant et furent sacrifiés aux soixante-dixième et quatre-vingt-quinzième jours : il y eut à l'autopsie réaction testiculaire moyenne et quelques fusées péritonéales ; quant aux poumons, ils montraient des migrations insignifiantes dans un cas, et n'en montraient point du tout dans l'autre. Cinq lapins reçurent, toujours dans l'huile et par voie testiculaire, 10 milligrammes de BCG vivant, soit la même dose que celle de bacilles morts précédemment inoculée. Non seulement la mort ne se produisit pas plus rapidement qu'avec les bacilles morts, mais, par un hasard curieux de l'expérience, 2 animaux seulement moururent spontanément (aux trentième et cinquantième jours), les autres étant sacrifiés aux quatre-vingt-troisième, quatre-vingt-quinzième et deux cent soixante-dixième jours. A l'autopsie, l'abcès testiculaire avait le volume habituel ; les atteintes péritonéales et viscéro-abdominales étaient abondantes dans 2 cas, discrètes dans 2 cas, absentes dans 1 cas ; quant aux lésions pulmonaires, il y eut hypertrophie considérable avec foyers broncho-pneumoniques étendus deux fois, hypertrophie et migrations moyennes une fois, migrations sans hypertrophie une fois, absence d'atteinte pulmonaire une fois. Deux lapins reçurent enfin, dans les mêmes conditions, 20 milligrammes de BCG vivant. L'un mourut au trente-cinquième jour avec de grosses lésions pulmonaires ; l'autre, sacrifié au soixante-dixième jour, n'en présentait que d'insignifiantes.

Ainsi, non seulement les lésions produites par le BCG vivant n'étaient pas plus considérables que celles produites par le BCG mort, mais elles étaient même, à tout prendre, un peu plus discrètes. Ceci peut d'ailleurs s'expliquer par le fait que les germes vivants inoculés représentent cinq fois moins de bacilles que la même quantité prise à l'état mort et desséchée, telle que nous l'avons précédemment employée. Il n'en reste pas moins que, dans les conditions particulières étudiées ici

et en considérant les résultats d'ensemble, *BCG vivant et BCG mort confondent leur action*. Par là se trouve clairement établie la primauté du constituant bacillaire dans le déterminisme des lésions, et non moins le peu d'importance de la pullulation du BCG à l'état vivant.

Toutefois, la constatation de lésions pulmonaires importantes produites par le BCG vivant soulevait la question de savoir si, par suite de l'enrobage huileux joint à l'injection intratesticulaire, ce germe n'avait pas *recouvré une partie de sa virulence*. Chose *a priori* bien improbable, puisque le BCG mort déterminait les mêmes lésions, mais il n'en était pas moins indispensable de voir ce qu'il en était. Dans des expériences poursuivies par l'un de nous avec C. Urquijo, le BCG fut isolé de ces lésions pulmonaires métastatiques et réinoculé à des doses variables, sans enrobage huileux bien entendu et par les voies d'introduction habituelles (intraveineuse, sous-cutanée), à plusieurs lapins. Les lésions relevées furent chaque fois celles que donne à l'heure actuelle d'une manière générale le BCG ; l'enrobage huileux et l'injection intratesticulaire n'avaient donc absolument rien changé à l'avirulence totale de ce germe.

Toutes ces expériences venaient établir d'une manière évidente le rôle primordial du constituant bacillaire dans le déterminisme des lésions. Et non seulement pour celles produites par les bacilles morts, mais aussi pour celles engendrées par les bacilles vivants. En cela, les résultats des inoculations du BCG vivant étaient particulièrement précieux, puisqu'ils montraient que même dans les conditions d'inoculation les plus favorables, l'activité pathogène déployée par un bacille vivant ne va pas au delà d'un certain seuil en quelque sorte préfixé, de la limite infranchissable que lui assigne sa complexion chimique et physico-chimique et qui est, pour le BCG, celle d'un bacille bovin de structure moyennement altérée. D'ailleurs, cette impossibilité de faire donner à un bacille tuberculeux, même avec le plus puissant artifice actuellement connu, autre chose que ce qu'il porte en lui-même, il y avait encore une autre manière de s'en convaincre : c'était en voyant si, dans les conditions d'inoculation exceptionnellement favorables employées dans nos expériences, le bacille *humain*

vivant restait, pour le lapin, aussi avirulent qu'il l'est dans les conditions habituelles.

Cinq lapins reçurent donc, par la voie testiculaire et après enrobage dans l'huile de vaseline, la dose véritablement énorme de 100 milligrammes de bacilles humains vivants et virulents. Deux de ces animaux moururent le troisième et le cinquième jour : les symptômes d'une intoxication généralisée s'étaient déclarés et l'on notait une congestion intense des viscères, en particulier des surrénales. Deux autres lapins moururent le vingt-deuxième et le trente-troisième jour, en montrant quelques migrations sur les organes abdominaux et de très rares granulations dans les poumons. Mais le dernier animal franchit sans encombre la période d'intoxication générale, et ne fut sacrifié qu'au sixième mois : il y avait un petit abcès dans le testicule, de très rares lésions en tache de suif sur les viscères abdominaux ; fait curieux, il existait aussi une ostéo arthrite de la patte antérieure gauche de laquelle on put isoler le germe inoculé, ostéo-arthrite comme on en observe communément chez le lapin avec les bacilles aviaires atténués. *Quant aux poumons, ils n'étaient pas hypertrophiés et ne présentaient que de très rares lésions en tache, superficielles, d'aspect cicatriciel.*

Mais il était nécessaire d'aller à des doses moins fortes. Deux lapins reçurent donc, toujours dans les mêmes conditions, 40 milligrammes de bacilles humains vivants et virulents, soit à peu près la même dose que celle de bacilles morts précédemment employée. Aucun de ces animaux ne mourut spontanément. Sacrifiés après trois mois, l'un et l'autre montrèrent un gros abcès testiculaire ; dans les poumons, il y eut quelques lésions granuliques disséminées, mais point d'hypertrophie notable — donc rien de plus que ce que les bacilles humains morts donnent habituellement. A l'évidence, même dans ces conditions privilégiées d'activité pathogène, le bacille humain vivant — à condition de ne pas être employé à des doses amenant une sommation toxique par trop grande, qu'amèneraient vraisemblablement tout autant des bacilles morts — ne donne chez le lapin rien de plus que ce que donne le bacille humain mort. Ici encore, l'essentiel est donc bien dans la constitution chimique et physico-chimique du corps

bacillaire, assignant à son pouvoir pathogène certaines limites, que ni les conditions d'injection les plus particulières, ni même la multiplication *in vivo*, ne sauraient franchir.

Corollaire de tout ceci, il était facile de prévoir que le pouvoir pathogène du bacille bovin *vivant et virulent* ne gagnerait pas grand'chose à s'exercer après enrobage huileux et injection testiculaire du germe. Avec 40 milligrammes de bacilles bovins, injectés à 2 lapins, ce fut la mort en *seize à dix-huit jours*, avec un tableau d'énorme granulie hémorragique ; avec 1 milligramme, ce fut la mort en trente jours avec grosse réaction locale, granulie généralisée avancée, confluyente, dans les poumons : or un animal témoin ayant reçu par voie testiculaire la même dose de bacilles *en suspension aqueuse* mourut au soixante-septième jour avec des lésions sensiblement identiques. Manifestement l'enrobage huileux n'avait pas ajouté grand'chose à l'activité pathogène du germe — que sa haute toxicité, jointe à sa reproduction active, appelaient de toute manière à triompher facilement du lapin.

Tels sont les quelques faits que nos expériences viennent mettre en lumière. En nous dégageant maintenant du détail des protocoles, voyons quels sont les problèmes qu'ils soulèvent de la manière la plus pressante et quelles réponses, d'ailleurs toutes provisoires, il est à l'heure actuelle possible de leur donner.

Le premier problème que l'on rencontre, c'est de savoir pourquoi les bacilles tuberculeux morts, incapables de donner des lésions métastatiques lorsqu'ils sont injectés en suspension aqueuse, en donnent si facilement lorsqu'ils sont enrobés dans l'huile de vaseline ; et aussi de savoir pourquoi ces lésions métastatiques, discrètes lorsque l'injection de l'huile bacillifère est faite par voie sous-cutanée, deviennent considérables lorsque l'injection est faite par voie intramusculaire. Voilà déjà deux questions bien importantes, celle du *mécanisme d'action* de l'huile de vaseline, et celle des *vertus particulières de la voie d'injection testiculaire*. D'autre part, il a été vu que les lésions produites par l'injection intratesticulaire de bacilles morts huileux étaient différentes selon le type de bacilles injecté, et que les différences étaient assez comparables à celles existant entre les lésions produites par les mêmes bacilles à

l'état vivant : ainsi se trouvent soulevés tout à la fois le problème du *pouvoir pathogène résiduel des bacilles morts et celui de leur spécificité résiduelle*, ce qui conduit tout naturellement à quelques considérations sur les notions de *virulence et d'atténuation du bacille tuberculeux vivant*.

1° LE RÔLE DE LA VOIE INTRATESTICULAIRE. — Commençons par le plus obscur. On ne sait absolument pas pourquoi la voie d'injection intratesticulaire est tellement favorable à la production de lésions métastatiques graves. Les conditions de résorption lymphatique sont exceptionnellement bonnes dans le testicule, cela paraît anatomiquement certain. Mais la résorption est-elle tout, ou y a-t-il encore autre chose ? Le testicule ajoute-t-il quelque chose à l'émulsion qui lui est injectée ou la transforme-t-il en un agent au pouvoir pathogène accru ? Rien de concret ne permet à l'heure actuelle d'accepter cette hypothèse, ni d'ailleurs de l'infirmier. Remarquons toutefois que ce n'est pas pour les seules lésions pulmonaires métastatiques que la singulière efficacité de la voie intratesticulaire a été remarquée. En étudiant l'allergie produite chez le cobaye par les bacilles morts enrobés d'huile, et ses variations selon la voie d'inoculation empruntée, l'un de nous a montré que la voie intratesticulaire était, après l'intrapulmonaire, de beaucoup la plus favorable, très supérieure à la sous-cutanée ou l'intramusculaire pour l'obtention de réactions allergiques particulièrement intenses, rappelant par leurs dimensions et leur aspect hémorragique le phénomène de Sanarelli-Shwartzman. D'ailleurs, cette allergie, nous ne la faisons pas dépendre des lésions métastatiques pulmonaires simultanément apparues. De même dans ses belles expériences sur l'immunité de surinfection antituberculeuse, A. Boquet a montré que c'est par la voie intratesticulaire que les bacilles de surinfection rencontrent la résistance la plus faible, qu'injectés par là, ils créent des lésions locales et ganglionnaires plus importantes que par toute autre voie. L'inoculation testiculaire est donc particulière à bien des égards, mais on ne sait absolument pas pourquoi.

2° LE MÉCANISME D'ACTION DE L'HUILE DE VASELINE. — Pour

tout dire, le mécanisme d'action de l'huile de vaseline reste encore très mystérieux. Mais au moins possède-t-on quelques jalons qui permettent de s'orienter, et aussi de prévoir dans quelle voie de futures recherches ont le plus de chance d'être fructueuses. Dès 1938, l'un de nous a d'ailleurs émis l'hypothèse que dans l'exaltation de l'allergie ainsi produite, l'huile de vaseline agissait à la manière des substances adjuvantes, telles que le tapioca dans l'immunité antidiphthérique et anti-tétanique (Ramon). En outre, nous continuions textuellement par ces mots : « L'huile de vaseline en modifiant le terrain au point d'inoculation provoque des phénomènes inflammatoires locaux qui favorisent l'intervention d'éléments cellulaires et humoraux responsables de l'augmentation de l'allergie et de l'immunité. » Dans des expériences récentes, R. Laporte s'est rallié à notre manière de voir. Il semble du reste que plusieurs facteurs s'intriquent dans ce mécanisme : la longue persistance sur place de l'huile, son haut degré d'émulsion, la protection qu'elle confère au bacille, enfin, peut-être, les modifications physico-chimiques qu'elle imprime au constituant bacillaire. Nous allons traiter ces divers points successivement :

a) *La longue persistance des huiles minérales dans les poumons.* — C'est un phénomène capital. Après avoir véhiculé les bacilles morts dans les poumons, l'huile de vaseline les maintient sur place aussi longtemps qu'elle y reste elle-même, ce qui n'est pas peu dire. Car les huiles minérales sont parmi les substances les plus inertes que l'on connaisse. Injectées sous la peau, on les retrouve pendant des mois et même des années au lieu d'injection, bien que fragmentées et morcelées à l'extrême. Arrivant dans le poumon, elles ne sauraient y tomber sous l'action lipodiérétique qu'exerce cet organe, puisque les huiles minérales sont des hydrocarbures et non des graisses : en cela, leur sort est totalement différent de celui du lipiodol, des autres huiles végétales et des huiles animales qui, — l'emploi quotidien du lipiodol en clinique le montre —, disparaissent assez rapidement du poumon, éliminées qu'elles sont en partie par les crachats, mais aussi attaquées et digérées qu'elles sont en tant que graisses véritables, leur persistance prolongée ne s'observant que dans cer-

taines conditions particulières, sur lesquelles ont judicieusement insisté Bezançon, Delarue et Valet-Bellot. Pour les huiles minérales, il n'est pas question de digestion. Leur départ ne peut se faire que par l'expectoration, éventualité inexistante chez l'animal, ou par la circulation lymphatique vers les ganglions trachéo-bronchiques, dont on sait justement le développement rudimentaire chez le lapin. C'est dire que la plus grande partie de l'huile minérale ne peut que rester longtemps sur place.

Cette longue persistance sur place de l'huile bacillifère est directement démontrée par trois ordres de faits concrets, observés à la fois chez le lapin, chez l'homme et chez le cobaye.

Chez le *lapin*, rappelons que des bacilles tuberculeux morts injectés trente jours après l'instillation intranasale d'huile de vaseline, produisent encore les mêmes lésions que les deux agents injectés simultanément. C'est dire que trente jours après son instillation, l'huile est encore présente dans le poumon. Et l'on peut concevoir de deux manières son mécanisme d'action lors de l'arrivée si tardive des bacilles. Ou bien, substance inerte bloquant les voies d'élimination lymphatiques du poumon, elle supprime l'un des modes d'élimination des bacilles morts nouvellement arrivés, aggrave donc leur action pathogène en les maintenant de force sur place. Ou bien, elle confère à tout phagocyte ayant capté une gouttelette d'huile une sorte d'accessibilité plus grande aux agents agresseurs nouveaux, sans nécessairement lui permettre de mieux les détruire. Ces modes d'action, qui interviennent vraisemblablement tous deux, ne sont point de simples vues de l'esprit, puisqu'on les voit jouer avec la plus grande netteté dans une maladie voisine, à bien des égards, de celle déterminée par l'arrivée d'huile dans le poumon, et qui est la silicose — comme l'un de nous l'a montré ailleurs. De toute manière, le rôle essentiel de la longue persistance sur place des huiles minérales est, chez le lapin, indéniable.

Chez *l'homme* — ceci dit entre parenthèses — la difficile élimination des huiles minérales pénétrant dans les poumons est démontrée par l'apparition, chez les personnes atteintes de la curieuse manie des instillations intranasales de produits à base d'huile minérale, d'une sclérose pulmonaire d'évolu-

tion lente, mais grave, dite « pneumonie huileuse », dont de nombreuses observations ont déjà été rapportées. Nous nous sommes longuement étendus sur cette maladie ailleurs.

Mais l'exemple du *cobaye* est peut-être de tous le plus instructif. On a vu plus haut que, chez le cobaye, les lésions pulmonaires consécutives à l'injection intratesticulaire d'huile minérale bacillifère n'atteignent jamais — tout en étant importantes — le volume parfois monstrueux qu'on leur voit prendre chez le lapin. Les cadavres bacillaires sont pourtant ici et là les mêmes. Mais c'est que la circulation lymphatique pulmonaire n'est pas la même ici et là, celle du cobaye étant autrement active que celle du lapin — ce que démontrent le volume des ganglions trachéo-bronchiques et l'importance des dispositifs musculaires (Allen Krause, Willis) assurant, dans les poumons du cobaye, la progression de la lymphe vers les émonctoires médiastinaux. De là résultent, chez cet animal, un moins long séjour pulmonaire des huiles minérales et, partant, de moins grandes possibilités d'activité pathogène pour les corps bacillaires qu'elles renferment. C'est bien ainsi que s'expliquent les différences entre les atteintes pulmonaires des deux animaux, pourtant développées dans des circonstances étiologiques tout à fait identiques.

Ces trois faits soulignent bien toute l'importance du facteur « long séjour sur place » dans le déterminisme de l'action pathogène de l'huile. Mais ce facteur n'est vraisemblablement pas tout.

b) *Le haut degré d'émulsion des huiles minérales dans le poumon.* — Il y a là une considération également importante. Dans ces expériences minutieuses destinées à déterminer les réactions du poumon à l'injection intratrachéale d'huiles diverses — végétales, animales et minérales — Pinkerton montre que, malgré leur inertie totale, les huiles minérales sont de loin celles qui s'émulsionnent le mieux dans le poumon du lapin. Cette singulière facilité d'émulsion explique l'intense phagocytose que leur arrivée détermine, chaque phagocyte apparaissant chargé d'une ou de plusieurs gouttelettes d'huile. Disons tout de suite que cette phagocytose n'entraîne nullement le départ de l'huile injectée, les phagocytes chargés d'huile restant très longtemps sur place et entraînant une

lente sclérose du poumon. On ne peut d'ailleurs rapprocher sans prudence les résultats d'injections intratrachéales de ceux d'injections intratesticulaires. Dans ce dernier cas, l'arrivée pulmonaire de l'huile ne peut, de toute manière, se faire que dans un état d'émulsion très fine, puisque les particules d'huile intracellulaires ou extracellulaires doivent franchir les capillaires lymphatiques et pénétrer dans des capillaires sanguins, avant de pouvoir s'arrêter dans les mailles du poumon. Les expériences de Pinkerton n'en montrent pas moins clairement que, tout irrésorbables qu'elles soient, les huiles minérales, s'émulsionnant en un grand nombre de particules très fines, pénètrent admirablement dans l'intimité des cellules, où *elles emmènent naturellement leur charge bacillaire*. A la longue persistance sur place de la suspension bacillifère s'ajouterait donc l'intensité de sa dispersion et l'intimité de son contact avec les cellules et les tissus.

c) *La protection des bacilles morts par l'enrobage huileux.* — Cette protection est considérable. Alors qu'en suspension aqueuse simple, les bacilles morts sont rapidement la proie de phagocytes qui les dégradent, ce qui amène leur complète disparition du lieu d'inoculation au bout d'un temps assez rapide et la guérison totale de la lésion qu'ils y ont déterminée, les bacilles enrobés dans l'huile persistent intacts de longs mois après l'inoculation, même si la gouttelette huileuse qui leur sert de support se trouve englobée dans un phagocyte. La carapace huileuse réalise donc une protection d'une grande efficacité, mettant le bacille longtemps à l'abri des efforts de défense de l'organisme, sans protéger pour cela l'organisme contre les efforts d'attaque du bacille.

d) *La modification de la constitution bacillaire par le contact huileux.* — Jusqu'ici n'ont été envisagés que les effets mécaniques de l'enrobage huileux : lenteur de résorption de l'huile bacillifère, intensité de sa dispersion pulmonaire, efficacité de la protection du bacille par l'huile. Tout le mystère de l'exaltation pathogène des bacilles morts portés dans l'huile minérale est-il expliqué par ces seules considérations ? Il est fort possible que non. Car on peut se demander si le contact huileux ne modifie pas le bacille lui-même, ne lui confère pas d'autres propriétés physico-chimiques. A l'action *mécanique*

de l'huile s'ajouterait donc une action *physico-chimique* plus profonde, action de modification du constituant bacillaire lui-même. Lorsqu'on compare l'énormité des lésions produites par les bacilles morts dans l'huile à l'exiguïté de celles données par les mêmes bacilles en suspension aqueuse, lorsqu'on a mesuré d'innombrables fois le haut degré d'allergie tuberculinique conféré par les huiles bacillifères, lorsque, enfin, on met en regard de tout cela le peu d'activité de l'huile et des bacilles morts pris isolément, on est bien tenté de croire qu'au contact de l'huile le cadavre bacillaire est devenu quelque chose de très différent de ce qu'il était auparavant, *à moins que ce ne soit l'huile elle-même qui ait acquis au contact des bacilles des propriétés réactionnelles nouvelles*. Des expériences récentes dues à M^{lle} N. Choucroun donnent à penser qu'il en est réellement ainsi. Cet auteur vient, en effet, de montrer que l'huile ayant subi le contact des bacilles, renferme après centrifugation et ultrafiltration une substance antigénique déterminant chez le lapin l'apparition d'anticorps variés strictement spécifiques du type bacillaire en cause ; cette même substance sensibilise le cobaye à la tuberculine. Ces recherches d'un puissant intérêt demandent à être poussées plus avant.

Telles sont les conceptions que l'on peut à l'heure actuelle avoir sur le mode d'action de l'huile de vaseline. Conceptions dont les unes — comme le long maintien des bacilles sur place par l'huile difficilement éliminée, leur intense dispersion, leur protection par la carapace huileuse — sont des certitudes histologiques et expérimentales ; dont les autres, comme la modification physico-chimique du bacille, appellent encore de nouvelles recherches. Et nous en arrivons au problème du pouvoir pathogène et de la spécificité résiduels des bacilles tuberculeux morts.

3° POUVOIR PATHOGÈNE ET SPÉCIFICITÉ RÉSIDUELS DES BACILLES TUBERCULEUX MORTS. — Un point très singulier que les expériences rapportées viennent mettre en lumière est celui de la différence d'action des diverses variétés de cadavres bacillaires et du parallélisme de ces différences d'action avec celles présentées par les mêmes bacilles à l'état vivant. Que le cadavre d'un bacille tuberculeux garde une action pathogène,

il y a près d'un demi-siècle qu'on le sait. Que les réactions histologiques au contact des bacilles morts ne soient pas d'essence différente de ce qu'elles sont au contact de bacilles vivants, il y a longtemps que Straus et Gamaleia l'ont souligné. Mais voici que, par l'enrobage huileux et l'injection testiculaire, se trouvent produites des lésions même *quantitativement* égales à celles des bacilles vivants, et, plus encore, des lésions *différentes* selon la variété de cadavre bacillaire employé, comme sont différentes entre elles les lésions produites par les mêmes variétés bacillaires à l'état vivant.

Il en résulte à l'évidence que le cadavre bacillaire conserve non seulement une partie du pouvoir pathogène des bacilles homologues vivants, mais qu'il conserve également ce que ce pouvoir pathogène a de spécifique. Cela, les seules injections huileuses introduites par des voies peu favorables aux métastases ne pouvaient le mettre en évidence, puisque les lésions locales dues aux diverses variétés d'acido-résistants sont à peu de chose près les mêmes, dans la première éventualité comme dans la seconde. Mais sous la double influence de l'enrobage huileux et de l'injection intratesticulaire propice aux métastases, se trouvent réalisées des conditions si favorables à l'exercice du pouvoir pathogène des bacilles morts que la découverte d'une *spécificité* résiduelle devient possible. Par le degré d'atteinte pulmonaire, une anonyme épave acido-résistante se révèle ainsi être un cadavre de bacille tuberculeux bovin ou aviaire encore doué de malignité, ou un résidu anodin de bacille humain, exempt d'action pathogène notable. L'enrobage huileux et l'injection génératrice de métastases ont donc agi comme un véritable révélateur, amplifiant le pouvoir pathogène résiduel des bacilles morts, et mettant par là à nu ce que le pouvoir pathogène conserve de spécifique. Car quel que soit le mode d'action, l'enrobage huileux n'a pas pu créer les différences, il les a trouvées toutes faites, susceptibles seulement d'être considérablement grossies par l'adjonction de l'huile. Aussi est-ce bien parce que des effets pathogènes différents répondent à une stimulation identique qu'il ressort clairement que le cadavre bacillaire reste, dans une large mesure, porteur des propriétés pathogènes spécifiques de l'espèce dont il est issu. Et s'il est vrai que la mort

ne supprime non seulement pas l'activité pathogène du bacille tuberculeux, mais qu'elle ne supprime même pas ce que cette activité a de spécifique, on est nécessairement conduit à examiner de près ce que peut signifier la notion de *virulence* du bacille tuberculeux *vivant*, comme d'ailleurs celle de son *atténuation*.

4° LES NOTIONS DE VIRULENCE ET D'ATTÉNUATION DU BACILLE TUBERCULEUX VIVANT. — Le point important est celui-ci. Si, comme nos expériences le démontrent, le bacille mort reste porteur des propriétés pathogènes spécifiques de l'espèce vivante, *il s'ensuit nécessairement que l'activité pathogène d'un bacille tuberculeux est plus étroitement liée à l'édifice bacillaire et à ses propriétés chimiques et physico-chimiques qu'aux propriétés biologiques — nutrition, reproduction — qui faisaient auparavant du constituant bacillaire un être animé de vie*. N'est-il pas évident que si on peut faire produire à un bacille mort des lésions et une maladie semblables à celles données par le bacille vivant, c'est que les phénomènes vitaux ne sont pas l'essentiel dans l'activité pathogène du bacille ? Dans nos expériences, l'enrobage huileux et l'injection intratesticulaire les ont remplacés, et efficacement remplacés. Ce n'est donc pas parce que le bacille tuberculeux respire, assimile et se reproduit qu'il est générateur de graves lésions, mais parce qu'il possède une constitution chimique et physico-chimique particulière, incompatible avec la santé des tissus et des cellules réceptives où il se trouve porté, pour peu qu'une certaine pérennité sur place lui soit assurée. Et ce n'est que par des modalités de ce nécessaire séjour sur place que l'action pathogène des bacilles morts diffère, dans son déterminisme, de celle des bacilles vivants. En cas de bacilles morts, c'est l'expérimentateur qui doit rendre possible le long séjour sur place : il emploie pour cela des doses bacillaires d'emblée très fortes, réalisant en quelque sorte par anticipation la reproduction des bacilles ; il les injecte par une voie hautement favorable à leur transport à distance, et surtout, il les enrobe d'huile, leur permettant ainsi, par la mise en jeu des mécanismes décrits plus haut, un meilleur exercice de leur action pathogène. En cas de bacilles vivants, c'est la *vie* elle-même

qui se charge de tout cela ; elle multiplie le pouvoir pathogène inclus dans le corps bacillaire, le porte loin, l'oblige à manifester sa présence, le renouvelle là où il est vaincu. Mais, pour être ainsi indispensable dans les conditions d'infection naturelle, *la vie n'en reste pas moins distincte du pouvoir pathogène, elle est autre chose que lui*. Porterait-elle le nombre de corps bacillaires aux taux les plus considérables, elle ne créera jamais de maladie s'il n'y a point, inclus dans le constituant bacillaire, un certain seuil de toxicité à l'égard de l'animal d'expérience en cause. Inversement, elle n'aura point à fournir un effort bien grand si la toxicité d'une variété bacillaire donnée est déjà, en chaque constituant bacillaire pris à l'unité, considérable. Et en conjuguant les deux notions de *toxicité* — ou, si l'on préfère, de *pouvoir pathogène* inclus dans le constituant bacillaire — et de *activité de reproduction* de ce constituant à l'état vivant, on obtient, et avec la plus parfaite rigueur, la notion de *virulence* d'un type bacillaire donné, laquelle virulence varie justement en fonction de l'une et l'autre de ces propriétés, et, pour une espèce animale donnée, ne varie qu'en fonction d'elles.

Car l'on peut, connaissant pour un type bacillaire deux des trois propriétés qui se trouvent ainsi indissolublement liées — pouvoir pathogène résiduel des bacilles morts, pullulement des bacilles vivants, lesquels se conjuguent pour donner la virulence des bacilles vivants — prévoir avec bien peu de chances d'erreur de quel ordre de grandeur sera la troisième. Nous l'avons déjà fait pour le BCG, en montrant que la relative toxicité de ses cadavres, jointe à l'avirulence totale du bacille à l'état vivant, rendait inévitable que son atténuation consistât surtout en une pauvreté extrême de son pullulement. C'est ce que les expériences indirectes relatées plus haut nous ont effectivement montré, et c'est ce que Lurie a directement établi, il y a six ans déjà, et avec la plus grande précision, en ensemençant à des intervalles réguliers des fragments d'organes de lapins ayant reçu par voie intraveineuse 4 milligramme de BCG vivant : sauf pour les ganglions médiastinaux et mésentériques où il y eut croissance jusqu'au quatorzième jour, la décroissance du nombre de colonies obtenu commença pour le poumon et la rate *dès le troisième jour* dans une série

d'expériences, *immédiatement après l'injection* dans une autre — alors que des bacilles bovins virulents ne commencent à arrêter leur multiplication dans le foie, la rate et la moelle que vers la quatrième ou même la huitième semaine, et ne l'arrêtent jamais dans le poumon, où leur nombre va croissant jusqu'à la mort de l'animal. Il y a donc bien, dans le cas du BCG, une difficulté extrême de la végétabilité *in vivo*.

Et de même, étant donné l'absence presque complète de toxicité du bacille humain mort à l'égard du lapin, était-il possible, certes non de prévoir que la reproduction du bacille humain vivant fût chez le lapin très active, mais du moins de comprendre que s'il en était ainsi, il n'y avait là rien d'incompatible avec l'avirulence bien connue du bacille humain pour le lapin. Or, Lurie a bien montré, il y a douze ans, que le bacille humain se reproduit très activement chez le lapin. Injecté par la voie intraveineuse aux doses de 0 milligr. 1 et 0 milligr. 001, il s'y multiplie même plus précocement que le bacille bovin, plus activement aussi pendant des semaines, quitte à entrer plus tôt dans la phase de destruction. Ce pullulement plus considérable du bacille humain chez le lapin démontre à l'évidence que la reproduction la plus active n'est rien si elle ne porte pas sur un corps bacillaire doué d'un minimum de toxicité.

Et rien n'est plus instructif que le rapprochement des deux exemples d'avirulence à l'égard du lapin qui viennent d'être donnés, celui du bacille humain et celui du BCG. Pour le BCG, l'avirulence résulte de l'insuffisante multiplication d'un corps bacillaire encore doué d'un pouvoir pathogène considérable. Pour le bacille humain, c'est d'un insignifiant pouvoir pathogène constitutionnel, que même la multiplication la plus active n'arrive point à porter au seuil de nocivité, que résulte l'avirulence à l'égard du lapin. Ce qui prouve que l'avirulence n'a pas partout le même mécanisme — donnée qui peut utilement s'appliquer à la notion d'*atténuation* du bacille tuberculeux.

Car on conçoit maintenant aisément, la chose n'a plus besoin de longs développements, que l'atténuation de virulence d'une souche bacillaire à l'égard d'un animal d'expérience donné puisse résulter, soit de la détérioration d'un

constituant bacillaire primitivement très pathogène, soit de l'inhibition de la multiplication d'un constituant bacillaire resté inchangé, soit de l'intrication des deux phénomènes. Pour le BCG, nous l'avons vu, c'est effectivement l'intrication des deux phénomènes que l'on observe, étant entendu que le second — inhibition du pullulement — prédomine, et de beaucoup. Mais rien n'indique qu'il en est nécessairement ainsi pour toutes les souches atténuées. Il en est vraisemblablement où la détérioration du constituant bacillaire est l'essentiel. Il en est sans doute d'autres où l'inhibition de multiplication existe à l'état de pureté, sans trace de modification du complexe bacillaire — comme c'est vraisemblablement le cas pour la majorité des souches *lupiques* presque avirulentes ou avirulentes, que nous avons récemment isolées et décrites. Car, bien que l'étude de leur pouvoir pathogène à l'état mort après enrobage huileux et injection intratesticulaire ne soit pas encore terminée, le fait que nombre d'entre elles donnent une tuberculine aussi active que celle provenant de souches des mammifères pleinement virulentes, permet d'ores et déjà de penser que ces souches ne présentent point de grandes modifications de leur complexion chimique et physico-chimique. Ce qui résoudrait, au moins partiellement, le paradoxe de leur haute activité pathogène chez l'homme et de leur avirulence totale chez l'animal d'expérience, expliquerait qu'elles peuvent créer les lésions *locales* graves et parfois mutilantes d'où elles furent isolées, sans pour cela se multiplier activement chez l'animal d'expérience — auquel d'ailleurs, tout avirulentes qu'elles soient, elles confèrent bien souvent une allergie à réactions nécrotiques, autre témoin de la non-altération de leur constitution chimique et physico-chimique.

CONCLUSIONS.

1° En inoculant au *cobaye*, par voie intratesticulaire, des bacilles tuberculeux morts, enrobés dans l'huile de vaseline, on observe l'apparition de lésions métastatiques pulmonaires bien plus importantes que par la voie sous-cutanée. Ces lésions sont égales pour le bacille humain et le bacille bovin.

2° En faisant au *lapin* la même injection intratesticulaire,

on détermine, s'il s'agit du bacille bovin mort, une véritable maladie à laquelle l'animal succombe le plus souvent en trente à soixante jours avec de grosses lésions pulmonaires faites d'hypertrophie, de caséification et d'injection hémorragique. S'il s'agit du bacille humain mort, il n'y a point de mort spontanée, et les lésions pulmonaires sont insignifiantes. S'il s'agit enfin du bacille aviaire mort, les lésions pulmonaires sont intermédiaires aux précédentes, à la fois granuliques et hémorragiques, et la mort spontanée s'observe fréquemment. Les lésions pulmonaires sont, pour chaque type bacillaire, très comparables à celles produites par les mêmes germes à l'état vivant.

3° En procédant à l'injection séparée des cadavres bacillaires, introduits par voie intraveineuse, et de l'huile de vaseline, introduite par voie intratrachéale, péritonéale ou intratesticulaire, on observe très souvent l'apparition de lésions pulmonaires en tous points comparables aux précédentes. Ces lésions se produisent même si l'injection bacillaire est de cinq, dix, quinze et même trente jours postérieure à l'instillation d'huile.

4° L'inoculation intratesticulaire du *BCG mort* enrobé dans l'huile de vaseline produit des lésions pulmonaires de peu inférieures à celles que donnent des bacilles bovins morts issus de souches virulentes. Il en ressort que la constitution chimique et physico-chimique du *BCG* est encore assez voisine de celle d'un bacille bovin virulent et que l'atténuation du *BCG* vivant consiste surtout dans une grande pauvreté de son pullulement.

5° L'inoculation intratesticulaire de *BCG* vivant en suspension huileuse détermine les mêmes lésions pulmonaires que celle de *BCG mort*. De même, les bacilles humains vivants identiquement inoculés ne produisent rien de plus que les bacilles humains morts. L'importance primordiale de la constitution chimique et physico-chimique dans le déterminisme pathogène des bacilles tuberculeux, même vivants, en est clairement démontrée.

6° Les lésions pulmonaires décrites ci-dessus se produisant sous le double effet de l'enrobage huileux et de l'injection intratesticulaire, il importe de savoir la part qui revient à l'une et à l'autre de ces circonstances étiologiques. On ignore

encore totalement pourquoi l'injection intratesticulaire favorise aussi grandement l'apparition des lésions à distance. Quant à l'enrobage huileux, on peut penser qu'il aggrave de plusieurs manières l'activité pathogène des bacilles morts : en les maintenant très longtemps dans le poumon d'où l'huile n'est que difficilement éliminée ; en les portant fort avant dans l'intimité des cellules des poumons où l'huile est fortement émulsionnée ; en leur constituant une carapace hautement protectrice et, peut-être, en modifiant leurs propriétés chimiques et physico-chimiques, ou en leur en conférant de nouvelles.

7° Les expériences ci-dessus rapportées établissent que les bacilles tuberculeux morts conservent non seulement une notable partie du pouvoir pathogène du bacille tuberculeux vivant, mais qu'ils conservent même ce que ce pouvoir a de spécifique. On peut dès lors considérer la virulence du bacille tuberculeux comme résultant de la conjugaison, d'une part, du pouvoir pathogène inclus dans le constituant bacillaire même mort à l'égard de l'espèce animale considérée, et, d'autre part, de la pullulation impartie au constituant bacillaire à l'état vivant.

8° On conçoit par là que l'atténuation ou l'absence de virulence d'un bacille tuberculeux pour une espèce donnée puisse résulter soit de l'insuffisante pullulation d'un constituant bacillaire, même doué d'un certain pouvoir pathogène — cas du BCG à l'égard du lapin —, soit de l'insuffisant pouvoir pathogène d'un constituant bacillaire, même doué d'une multiplication active — cas du bacille humain à l'égard du lapin —, soit de l'intrication de ces deux mécanismes.

BIBLIOGRAPHIE

- BEZANÇON, DELARUE et VALET-BELLOT. *Ann. Anat. Path.*, **12**, 1935, p. 229.
BEZANÇON et PHILIBERT. *Congrès International de la Tuberc.*, **1**, 1905, p. 29.
BOQUET (A.). *Ces Annales*, **50**, 1933, p. 5.
BOQUET (A.) et NÈGRE (L.). *C. R. Soc. Biol.*, **91**, 1924, p. 335 ; *Ces Annales*, **40**, 1926, p. 11.
BRANCH et CUFF. *Journ. Infec. Dis.*, **47**, 1930, p. 742.
CANETTI (G.). « Les réinfections tuberculeuses latentes du poumon ». *Thèse Paris*, 1939, Vigot, éditeur.

- CASALS et FREUND. *Journ. Immun.*, vol. XXXVI, 1939, p. 399.
- CHOUCROUN (M^{lle} N.). *C. R. Acad. des Sciences*, **208**, 1939, p. 1757.
- COULAUD. *Rev. Tuberc.*, **2**, 1934, p. 851 ; *Bull. Acad. de Méd.*, **115**, 1936, p. 232 ; *Ibid.*, **117**, 1937, p. 368.
- FREUND, CASALS et HOSMER. *Proc. Soc. fr. Exp. Biol. a. Med.*, **37**, 1937, p. 309.
- CRAWFORD. *Journ. Vet. Med. Assoc.*, **64**, 1931, p. 436.
- HAEFLINGER (E.). *Zeit. f. Tuberk.*, **82**, 1939, p. 91-101.
- HAGAN et LEVINE. *Journ. Amer. Veter. Med. Assoc.*, **81**, 1932, p. 723.
- HENSEL. *Beit. Klin. der Tuberk.*, B. 90, n° 4, 1937, p. 387 ; *Ibid.*, B. 91, 1938, p. 442-446.
- KORN et TOBLER. *Hyg. Rundsch.*, B. 4, 1897, p. 46.
- KRAUSE (Allen). *Amer. Rev. Tuberc.*, **14**, 1926, p. 243.
- LAPORTE (R.). *C. R. Soc. Biol.*, **130**, 1939, p. 611 et 1170 ; *Ibid.*, **133**, 1940, p. 63.
- LE MOIGNIC et PINOY. *C. R. Soc. Biol.*, **79**, 1916, p. 201 et 352.
- LURIE (Max. B.). *Journ. Exper. Med.*, **60**, 1934, p. 163-178 ; *Ibid.*, **48**, 1928, p. 155-182.
- PETROFF et STEWART. *Journ. Immun.*, **10**, 1925, p. 342.
- PINKERTON. *Arch. Path.*, **5**, 1928, p. 380.
- RABINOWITSCH (L.). *Deut. Med. Wochens.*, vol. III, 1897, p. 507.
- RIST (Noël). *Thèse Paris*, 1938, Le François, édit. ; *Ces Annales*, **61**, 1938, p. 121.
- RAMON (G.). *Rev. Immun.*, **1**, 1935, p. 199 ; *Ibid.*, **193**, 1937, p. 193 et 202.
- SAENZ (A.). *C. R. Soc. Biol.*, **120**, 1935, p. 870 et 1050 ; *Ibid.*, **121**, 1936, p. 957 et 1561 ; *Ibid.*, **122**, 1936, p. 911 ; *Ibid.*, **124**, 1937, p. 338 et 1161 ; *Ibid.*, **125**, 1937, p. 495 et 714 ; *Rev. Immun.*, **4**, 1937, p. 530-541 ; *Ces Annales*, **60**, 1938, p. 58-96 ; *C. R. Soc. Biol.*, **130**, 1939, p. 219 ; *Rev. Tuberc.*, **5**, 1939-1940, p. 1030.
- SAENZ (A.) et CANETTI (G.). *C. R. Soc. Biol.*, **129**, 1938, p. 201 ; *La Presse médicale*, n° 42, 1939, p. 849 ; *C. R. Soc. Biol.*, **131**, 1939, p. 436.
- STRAUS et GAMALEIA. *Arch. Med. Exp.*, **3**, 1891, p. 705.
- THOMPSON. *Amer. Rev. Tuberc.*, **26**, 1932, p. 162.
- VALLÉE (H.). *C. R. Acad. des Sciences*, **178**, 1924, p. 152 ; *Rev. Gen. Med. Vet.*, **33**, 1924, p. 1.
- VELU (H.), ZOTTNER et SARTHOU. *C. R. Soc. Biol.*, **119**, 1935, p. 857.
- WILLIS. *Amer. Rev. Tuberc.*, **14**, 1926, p. 232.

RECHERCHES SUR LA TRANSMISSION EXPÉRIMENTALE DE LA MONONUCLÉOSE INFECTIEUSE AU SINGE ET A L'HOMME

par R. SOHIER, P. LÉPINE et V. SAUTTER.

(*Institut Pasteur et Service des Contagieux du Val-de-Grâce.*)

Bien que, depuis longtemps déjà, on ait isolé la « mononucléose infectieuse » du vaste groupe des adénolymphoïdites, on ne pouvait pas, jusqu'à une époque récente, affirmer l'autonomie et la spécificité de cette affection. C'est du moins l'impression qui se dégage d'un bref historique des recherches entreprises sur ce sujet.

En effet, pendant une première période dont le début remonte à 1889, on décrivit successivement la fièvre glandulaire (1), la mononucléose infectieuse, l'angine à monocytes et ainsi, en se basant sur des caractères cliniques et hématologiques, on en arriva à isoler une affection donnant l'impression d'une maladie autonome dont P. Chevallier (2) a résumé les caractères essentiels en la définissant : adénolymphoïdite aiguë bénigne avec hyperleucocytose modérée et forte mononucléose. Mais, en l'absence d'agent étiologique décelable malgré les nombreuses recherches entreprises, des incertitudes subsistaient quant à la spécificité de cette maladie, incertitudes entretenues d'ailleurs par les diverses terminologies adoptées. L'affection décrite sous le nom de fièvre glandulaire des enfants était surtout l'objet de discussions :

(1) PFEIFFER. *Drüsenfieber. Jahrb. f. Kinder.* 29, 1889, p. 257.

(2) P. CHEVALLIER. L'adénolymphoïdite aiguë bénigne avec hyperleucocytose modérée et forte mononucléose. *Revue de Pathologie Comparée*, éditeur, Paris 1928. (Bibliographie importante jusqu'à 1928). — Voir également pour la bibliographie : SABRAZÈS et SARIC. *Angines lympho-monocytaires, agranulocytoses, leucémies leucopéniques*. Masson et C^{ie}, éditeurs, Paris, 1938.

de nombreux médecins considéraient qu'il s'agissait d'un syndrome à étiologies multiples.

Dans une deuxième période plus récente, les recherches sérologiques devaient apporter, sous forme du test d'agglutination connu actuellement sous le nom de réaction de Paul et Bunnell (3)-Davidsohn (4), d'utiles arguments à ceux qui considéraient la mononuclease infectieuse comme une entité morbide définie. Les travaux effectués à l'étranger, en particulier en Amérique, et ceux publiés en France par Demanche (5) et par l'un de nous (6), concluaient à la spécificité du test d'agglutination en raison de la constance avec laquelle il est positif dans les formes cliniquement typiques de la mononuclease infectieuse, et négatif dans des affections diverses et en particulier dans celles qui, tout en ayant une symptomatologie voisine de celle de l'adénolymphoïdite aiguë bénigne, s'en distinguent nettement par leur étiologie.

Mais l'autonomie de la mononuclease infectieuse, comme du reste la spécificité de la réaction sérologique d'agglutination, ne pouvaient être affirmées de façon absolue qu'après reproduction expérimentale de la maladie et, si possible, isolement de l'agent pathogène qui la provoquait.

Nous avons donc poursuivi une série de recherches dans ce sens au cours de l'année écoulée et nous nous proposons de rapporter les résultats de notre expérimentation. Les constatations que nous avons pu faire, n'apportent pas une solution à tous les problèmes qui ont pu se poser au cours de l'étude de la mononuclease infectieuse ; elles devront être complétées et en particulier plusieurs fois retrouvées au cours d'une expérimentation analogue. Mais la guerre ayant interrompu brusquement nos recherches, et ce pour une durée indéfinie, nous croyons pouvoir faire part de nos observations

(3) PAUL (J. R.) and BUNNELL (W. W.). *Amer. Jour. M. Sc.*, **183**, janvier 1932, p. 90-104.

(4) DAVIDSOHN. *Jour. of Am. Med. Assoc.*, 23 janvier 1937, p. 289.

(5) DEMANCHE. *Le Sang*, **12**, n° 1938, p. 86 et *Presse Médicale*, n° 92-93, 1940, p. 1614.

(6) SOHIER (R.), PARNET (J.) et BERNIER (G.). *Bull. et Mém. Soc. Méd. Hôpitaux de Paris*, n° 18, 19 mai 1939.

et des remarques qu'elles appellent, ainsi que des hypothèses qu'elles permettent de formuler.

Nous nous proposons de transmettre expérimentalement la maladie au singe, puis à l'homme et, si possible, de reproduire les symptômes cliniques et hématologiques observés dans la maladie humaine ainsi que les modifications sérologiques que le test d'agglutination met en évidence.

Nous exposerons successivement les conditions dans lesquelles nous avons conduit notre expérimentation, puis les constatations que nous avons pu faire et enfin les commentaires qu'elles nous ont paru comporter.

Nous avons inoculé un singe avec du sang prélevé chez un malade dont l'affection était en pleine évolution. Il s'agissait d'un jeune officier entré dans notre service pour une angine pseudo-membraneuse évoluant depuis six jours et considérée par le médecin qui nous avait adressé le malade comme de nature diphtérique. En fait, on constatait sur les amygdales, les piliers du voile et la face postérieure de la luette une fausse membrane épaisse recouvrant une exulcération saignant facilement au moindre attouchement et entourée d'une zone d'œdème. L'haleine était fétide. De nombreuses adénopathies du volume d'une noisette étaient décelées dans la région cervicale et sous-angulo-maxillaire. La rate était hypertrophiée et palpable. La température était de 39°6, le pouls battait à 90-100. Il n'y avait pas d'albuminurie. La recherche des bacilles diphtériques faite dès l'entrée du malade était négative, ainsi qu'à plusieurs examens effectués ultérieurement ; le sujet avait du reste été vacciné en 1937 contre la diphtérie.

L'aspect de la gorge, les adénopathies, la splénomégalie, les signes généraux, l'atteinte de l'état général, sans signes toutefois de toxinfection, nous incitaient à rechercher des modifications éventuelles du sang. Or la formule hémoleucocytaire établie le lendemain de l'entrée était la suivante :

Polynucléaires neutrophiles 32, lymphocytes et moyens mononucléaires 45,5, monocytes (dont beaucoup altérés à protoplasme pâle, à granulations azurophiles peu visibles) 22, cellules de type Türck 0,5, présence de quelques plaques réticulées.

Le 27 juin, à un examen plus complet, on comptait : Hématies : 4.831.000. Leucocytes 14.100 dont poly. neutrophiles. 37,5, lymphocytes 7,5, moyens mononucléaires (la plupart altérés) 41,5, monocytes 13, cellules type Türck 0,5, présence de plaques réticulées.

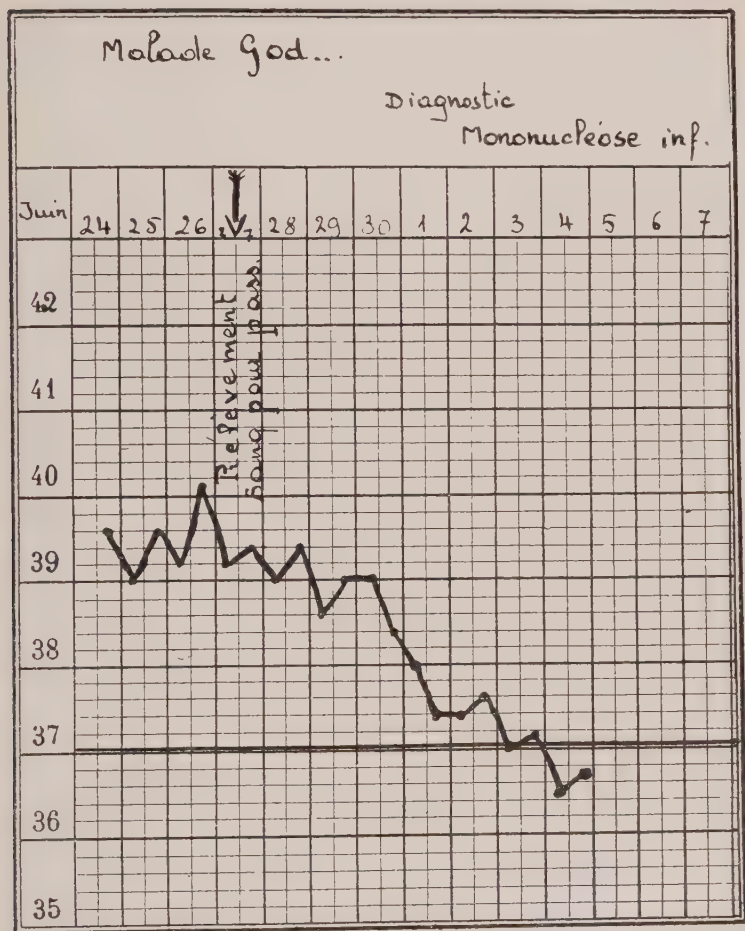
Une réaction de Paul-Bunnell pratiquée le même jour était positive au 1/112 avec absorption spécifique des agglutinines par les hématies de bœuf :

SO : 2221100000 ; Sb : 0000000000 ; Sc : 2211100000 (7).

(7) Les notations correspondant à SO : sérum pur ; Sb : sérum + extrait hématies de bœuf ; Sc : sérum + extrait rein de cobaye.

On était donc en présence d'une mononucléose infectieuse des plus typiques. Le 27 juillet alors que la température était de $39^{\circ}4$ (voir courbe I), du sang fut prélevé chez ce malade pour inoculation.

Après avoir été défibriné rapidement et transporté au Laboratoire



COURBE I.

de l'Institut Pasteur, il fut inoculé une demi-heure après son prélèvement à un *Macacus rhesus* mâle, à la dose de 4 cent. cubes, dans les muscles de la patte postérieure droite et 1 cent. cube par voie sous-cutanée. Du sang avait été prélevé chez le singe immédiatement avant l'inoculation, d'une part pour effectuer une numération globulaire et une formule hémoleucocytaire qui donnait le résultat suivant :

Hématies : 6.200.000. Leucocytes : 18.000 dont poly. neutrophiles : 87 ; poly. éosinophiles : 1 ; lymphocytes : 9 ; monocytes : 3 ;

d'autre part pour une réaction de Paul-Bunnell. Cette réaction était négative et s'écrivait :

SO : 4000000000 ; Sb : 4000000000 ; Sc : 0000000000.

L'animal fut soigneusement observé par la suite. Nous avons recherché en particulier les modifications hématologiques et sérologiques, les variations de la température, enfin les signes cliniques et en particulier les adénopathies et la splénomégalie.

Notons de suite que les signes cliniques furent pratiquement inexistants, de petites adénopathies qui avaient été constatées dès avant l'inoculation ne furent pas notablement modifiées, non plus d'ailleurs que le volume de la rate. Les modifications hématologiques assez importantes figurent dans le tableau ci-dessous :

	27 JUN	30 JUN	4 ^{er} JUILLET	3 JUILLET	7 JUILLET	10 JUILLET	12 JUILLET	13 JUILLET	17 JUILLET	24 JUILLET
	(1)							(2)		
Leucocytes.	18.000	27.000	23.400	16.700	26 400	19.500	22.100			
Poly. neutrophiles . . .	87	71	79	67	78	69	34	46	44	59
Poly. éosinophiles . . .	1									
Poly. basophiles										
Lymphocytes et moyens mononucléaires . . .	9	24	20	34	41	16	40	22	44	31
Monocytes	3	5	1	2	41	43	24	30	12	10
Cellules type Türk . .						2	2	2	1	

(1) Avant inoculation.

(2) Passage homme.

A signaler en outre aux examens des 10, 12, 13, 17, 24, la présence de quelques normoblastes, sans que l'on note par ailleurs d'autres éléments anormaux ni d'altération des hématies.

Quant aux modifications thermiques elles sont reproduites sur la courbe II.

Le 13 juillet, en raison des modifications hématologiques observées et de l'apparition d'une légère hyperthermie, nous décidions, malgré l'absence de signes cliniques décelables, de prélever du sang chez le singe, en vue de tenter un passage chez l'homme.

Une partie du sang prélevé chez le singe fut réservée pour une réaction d'agglutination de Paul-Bunnell qui fut négative :

SO : 1000000000 ; Sb : 1000000000 ; Sc : 0000000000.

Six cent. cubes de sang citraté furent injectés, une heure après prélèvement, par voie intramusculaire chez un jeune sujet de dix-huit

ans, interné dans un asile, depuis plusieurs années, pour débilité mentale congénitale. Nous avons pris soin également de prélever du sang chez ce sujet quelques minutes avant l'inoculation, pour effectuer une numération globulaire et une formule hémoleucocytaire, donnant le résultat suivant : hématies : 3.380.000 ; leucocytes : 6.700, dont poly. neutrophiles : 50 ; poly. éosinophiles : 5 ; poly. basophiles : 1 ; lymphocytes et moyens mononucléaires : 37 ; monocytes : 7.



COURBE II.

Une réaction de Paul-Bunnell, pratiquée sur du sang prélevé au même moment, donnait un résultat négatif :

SO : 1110000000 ; Sb : 1100000000 ; Sc : 0000000000.

L'examen hématologique et sérologique ne révélait donc aucune anomalie, non plus du reste que l'examen clinique qui, en dehors du déficit psychique ancien, ne mettait en évidence aucun signe d'affection en évolution et en particulier ni adénopathie, ni splénomégalie.

Ce dément était placé dans une salle avec quelques autres psychopathes et nous préciserons, pour ne plus y revenir, qu'aucun d'eux n'a présenté pendant tout le temps qu'a duré l'observation de signes permettant de penser à une mononucléose infectieuse.

Le jeune sujet inoculé fut observé pendant deux mois. Sa température était prise chaque jour, elle devait rester d'ailleurs constamment normale. Des examens hématologiques furent pratiqués périodiquement.

Le 29 juillet 1939, alors que rien ne décelait apparemment l'évolution d'une adénolymphoïdite, ni lésions de l'oropharynx, ni adénopathies, ni splénomégalie, l'examen hématologique ne révélait que de légères modifications : hématies : 5.320.000 ; leucocytes : 8.900, dont poly. neutro., 49 p. 100, éosinophiles 9 p. 100, lymphocytes et moyens mononucléaires 36 p. 100, monocytes 6 p. 100.

Mais une réaction de Paul-Bunnell donnait le résultat suivant :

SO : 2222110000 ; Sb : 0000000000 ; Sc : 2221100000.

Elle était donc très nettement positive, avec un taux limite de 1/224 et une absorption très nette et exclusive des agglutinines par l'extrait d'hématies de bœuf.

Devant ce résultat que rien par ailleurs ne laissait prévoir à un moment où nous pensions avoir échoué dans notre expérimentation, nous avons suivi le patient très attentivement. Or, à aucun moment, il n'a présenté de signes cliniques d'adénolymphoïdite, mais par contre nous avons assisté à une modification du sang, se traduisant par l'apparition d'une mononucléose à 51 p. 100.

La formule faite le 7 août 1939 sur 200 éléments était la suivante : poly. neutrophiles : 36 p. 100 ; éosinophiles : 13 p. 100 ; lymphocytes et moyens mononucléaires : 49,5 p. 100 ; monocytes : 1,5 p. 100. Les moyens mononucléaires étaient souvent atypiques avec un protoplasme clair parfois vacuolaire et des noyaux à chromatine lâche.

Le 12 août, la formule hémoleucocytaire s'était modifiée et la mononucléose s'accroissait : poly. neutro : 32 p. 100 ; poly. éosinophiles : 9 p. 100 ; baso. : 0 ; lymphocytes et moyens mononucléaires : 56,5 p. 100 ; monocytes : 2,5 p. 100.

Une réaction de Paul-Bunnell faite le 18 août était encore positive au 1/56. :

SO : 2111000000 ; Sb : 0000000000 ; Sc : 1100000000.

On remarquera toutefois que le taux des agglutinines avait déjà diminué.

Parallèlement on constatait un retour progressif à un pourcentage hémoleucocytaire voisin de la normale avec : poly. neutro., 57 ; poly. éosino., 3 ; lymphocytes et moyens mononucléaires, 36,5 p. 100 ; monocytes 2,5 p. 100. Le 27 août, la réaction de Paul-Bunnell était négative.

Dans les semaines qui suivirent l'inoculation et pendant les deux mois que dura l'observation du sujet inoculé, on ne devait plus constater de modification de l'équilibre leucocytaire, ni aucune atteinte oropharyngée, ganglionnaire ou splénique. Nous avons pu avoir récemment de ses nouvelles, il paraissait en parfaite santé.

Notons également que le singe chez lequel le sang avait été prélevé ne devait pas présenter de signes cliniques nouveaux : la poussée thermique n'avait duré que quelques jours. La mononucléose avait régressé. Quant à la réaction de Paul-Bunnell, elle ne put être pratiquée.

De l'expérimentation dont nous venons de rapporter les

temps principaux, nous croyons pouvoir retenir essentiellement les faits suivants :

Le matériel virulent ayant servi à l'essai de transmission expérimentale, en l'espèce le sang défibriné, a été prélevé chez un sujet présentant une mononucléose infectieuse des plus typiques en pleine évolution. On retrouvait, en effet, chez lui tous les signes cliniques, hématologiques et sérologiques considérés, en l'état actuel de nos connaissances, comme caractéristiques de cette affection.

Chez un singe, apparemment indemne de toute maladie en évolution, l'injection de sang prélevé dans les conditions qui viennent d'être rappelées a été suivie, quinze jours après l'inoculation, de l'apparition d'une poussée fébrile nette, d'une réaction sanguine avec mononucléose manifeste et leucocytose légère. L'une et l'autre ont régressé rapidement, sans que l'on ait pu constater de signes cliniques d'adéno-lymphoïdite, ni que l'examen sérologique, du moins celui fait au maximum de la poussée thermique et de la mononucléose sanguine, ait donné de test d'agglutination positif.

Chez un jeune dément inoculé avec du sang citraté prélevé chez le singe au moment de la pyrexie et de la réaction leucocytaire à mononucléaires, sont apparues, seize jours après l'inoculation et malgré l'absence de toute manifestation clinique décelable, des modifications sanguines se traduisant par une réaction de Paul et Bunnell nettement positive et une mononucléose sanguine. Celle-ci fut du reste transitoire, mais le test d'agglutination était encore positif après trente-six jours, à un taux moindre il est vrai, puis il redevenait à nouveau négatif quarante-cinq jours après l'inoculation.

Nous étions amenés à nous demander, d'une part si nous avions transmis expérimentalement la mononucléose infectieuse de l'homme au singe, d'autre part si cette affection avait été secondairement transmise du singe à l'homme.

Rappelons avant toute discussion que les essais de transmission expérimentale de la mononucléose et les recherches destinées à en déceler l'agent étiologique ont été nombreuses, mais les résultats de beaucoup d'entre elles ont été discutés en particulier ceux obtenus par Sabrazès, Murray, Webb et

Swann (8), Nyfeldt (9), à propos de la mononucléose observée chez les lapins et de la mise en évidence des bacilles monocytogènes. De même les observations de Bland (10), reproduisant par injection de sang citraté de sujet atteint de mononucléose infectieuse, une infection mortelle, infection qui aurait pu être transmise au singe et aurait déterminé chez cet animal un syndrome lymphadénique hépato-splénomégaly avec fièvre et mononucléose sanguine. Citons surtout les recherches plus récentes de Van den Berghe et Liessens (11) qui, chez le *Macacus rhesus*, trois semaines après l'inoculation de sang d'un enfant atteint d'une angine avec adénopathie, fièvre, leucocytose et monocytose sans mononucléose, observent chez le singe une monocytose légère sans mononucléose, mais pas de fièvre et pas d'adénopathie. Il y a lieu de remarquer que ces observations ne paraissent pas absolument démonstratives, car le syndrome présenté par l'enfant dont le sang a servi à l'inoculation, n'était pas typiquement celui de la mononucléose sanguine, et qu'en outre les troubles observés chez le singe s'écartent notablement de ceux qui caractérisent la mononucléose infectieuse, les animaux ayant présenté une leucopénie très nette, avec monocytose légère mais sans mononucléose importante.

En 1939, Wising (12) en inoculant à des macaques un broyat de ganglion prélevé chez deux malades atteints de mononucléose infectieuse, constatait, huit à dix-huit jours après, des adénopathies généralisées avec mononucléose sanguine légère, toutes modifications transmissibles par passages réalisés toujours par inoculation de ganglions extirpés et broyés. Il réussissait ainsi 5 passages successifs. Mais surtout le fait le plus intéressant, observé par Wising, est la transmission accidentelle de la maladie à un de ses assistants qui,

(8) MURRAY WEBB et SWANN. *Jour. of Pathol. and Bact.* **29**, 1926, p. 107.

(9) NYFELDT. *C. R. Soc. Biol.*, **101**, p. 590.

(10) BLAND. *The Lancet*, 1930, p. 521 et *Brit. Jour. exp. Path.*, **12**, 1931, p. 311.

(11) VAN DEN BERGHE et LIESENS. *C. R. Soc. Biologie*, **130**, 1939, p. 279 et **131**, p. 156.

(12) WISING. *Acta Medica Scandinavica*, **98**, fasc. IV-V, 1939.

blessé avec un couteau ayant coupé un ganglion prélevé chez un singe malade, présentait sept jours plus tard une mononucléose infectieuse typique. C'est là, du moins à notre connaissance, le seul fait de ce genre, observé chez l'homme.

Ces faits rappelés, nous essayerons de répondre aux deux questions que nous avons été amenés à nous poser à la suite de notre expérimentation.

Avons-nous transmis au singe la maladie humaine ?

Si, cliniquement, rien ne permettait de répondre à cette question, par contre la constatation d'une poussée fébrile et d'une mononucléose sanguine des plus nettes, deux symptômes retrouvés dans la mononucléose humaine, pouvaient traduire l'évolution chez le singe d'une affection semblable à celle observée chez le malade dont le sang avait été inoculé. Le délai d'apparition du syndrome chez le singe était comparable à celui noté par Wising, en particulier au cours de son expérimentation.

Il nous manquait cependant la constatation d'une réaction de Paul et Bunnell positive. On sait sa valeur dans la maladie humaine, nous y reviendrons ultérieurement. Van den Berghe et Liessens l'auraient trouvée positive chez les sujets inoculés. Wising, du moins à s'en tenir à la traduction que nous avons pu lire, n'en parle pas dans son mémoire en ce qui concerne les singes. Il convient de noter que nous n'avons recherché le test d'agglutination que deux fois, d'une part avant l'inoculation, d'autre part pendant la réaction fébrile et que si elle était négative à ce moment, elle aurait pu par la suite devenir positive, comme cela a été observé chez l'homme.

Nous regrettons que les circonstances ne nous aient pas permis de refaire cette réaction en temps voulu.

Cette absence du test sérologique et celle du syndrome clinique d'adénolymphoïdite, le fait aussi que la fièvre et la mononucléose sanguine s'observent parfois dans des affections différentes de la mononucléose infectieuse, enfin la constatation d'une réaction normoblastique qui manque au cours de la maladie humaine, puisqu'on n'observe pas de modifications quantitatives ni qualitatives des hématies, pouvaient nous faire craindre un échec de notre tentative.

Il semble cependant que les faits observés dans la deuxième partie de notre expérimentation, autorisent à penser que notre essai n'a pas été inutile.

Certes, chez le sujet inoculé avec le sang du singe, nous n'avons pas obtenu la reproduction du syndrome splénoganglionnaire observé dans la maladie humaine ; en outre, nous n'avons pas observé de réaction fébrile. Mais nous avons provoqué, quinze jours après l'inoculation du sang prélevé chez le singe malade, l'apparition de modifications sérologiques se traduisant par une réaction de Paul et Bunnell nettement positive, puis une réaction sanguine à mononucléaires.

Or, la réaction de Paul et Bunnell a évolué, chez le sujet inoculé, de la même façon que chez les malades atteints de mononucléose infectieuse. Elle s'est accompagnée d'une réaction sanguine avec mononucléose des plus nettes, constatée simultanément mais qui fut de courte durée.

L'apparition d'une réaction d'agglutination nettement positive est, croyons-nous, le fait le plus important. Tous ceux qui ont étudié le test d'agglutination le considèrent comme spécifique de la mononucléose infectieuse ; nous avons apporté récemment des arguments en faveur de cette spécificité.

De fait, la réaction de Paul-Bunnell a toujours été positive dans les cas de mononucléose infectieuse typique, mais on doit retenir surtout que jamais elle n'a été positive, à notre connaissance du moins, chez des sujets sains, ou dans un grand nombre de syndromes d'étiologies distinctes, mais dont les signes cliniques et hématologiques sont parfois très peu différents de ceux observés dans la mononucléose infectieuse (rubéole, etc.). Elle est donc considérée comme un des meilleurs critères de l'existence d'une mononucléose infectieuse, maladie autonome spécifique. C'est l'opinion de nombreux sérologistes et de Demanche en particulier en France, comme également de cliniciens comme Lemierre (13) qui ont eu l'occasion d'observer de nombreux cas de mononucléose infectieuse. De ce fait, l'apparition d'une réaction positive chez le sujet inoculé a, croyons-nous, une très grande valeur.

(13) LEMIERRE. *Journal des Praticiens*, n° 24, 17 juin 1939.

Il est évidemment toujours possible d'admettre dans notre expérimentation une cause d'erreur et, en particulier, une coïncidence telle que le jeune sujet inoculé aurait contracté une mononucléose infectieuse pendant que nous l'observions. Nous avons pris soin cependant de vérifier la négativité de la réaction avant l'inoculation et les délais d'évolution, les conditions d'observation permettent d'écarter, selon toute vraisemblance, une coïncidence qui, au demeurant, aurait été bien curieuse.

On pourrait aussi objecter que l'injection de protéines étrangères (sang de singe) pourrait provoquer des modifications du sérum telles que celui-ci donne la réaction d'agglutination. On sait que chez l'homme les injections de sérum de cheval font apparaître dans le sérum des agglutinines anti-mouton. Mais elles sont du type Forsmann et jamais absorbées par les extraits d'hématies de bœuf ; or les agglutinines décelées dans le sang du sujet inoculé étaient bien du type de celles constatées au cours de la mononucléose infectieuse : elles étaient absorbées par les hématies de bœuf.

Etant donné la signification précise que l'on attribue jusqu'ici à la réaction d'agglutination de Paul et Bunnell, nous pensons que son apparition et son évolution chez le patient inoculé peuvent être considérées comme résultant de l'inoculation pratiquée. Elle pourrait donc être considérée comme traduisant la transmission à l'homme, après passage chez le singe, sinon de la maladie typique, du moins d'une forme cliniquement anormale, mais s'accompagnant des modifications sanguines et, en particulier, humorales de la maladie classique.

Rapprochée des faits constatés par Wising, et en particulier de la transmission accidentelle de la maladie du singe à l'homme observée par cet expérimentateur, transmission unique à ce jour, du moins à notre connaissance, notre observation peut présenter un certain intérêt.

S'il est démontré qu'aucune cause d'erreur n'a pu en troubler l'interprétation, des questions nouvelles pourront se poser à son propos : existence des formes atypiques chez le singe, existence de formes cliniquement inapparentes chez

l'homme. Il conviendrait alors de rechercher si des faits de ce genre sont observés spontanément chez l'homme. La recherche de modifications hématologiques et de la réaction de Paul-Bunnell chez des sujets vivant au contact d'un malade permettrait peut-être d'être fixé sur ce point.

Nous ne doutons pas que la reproduction en série des faits que nous avons observés soit nécessaire pour donner toute sa valeur à notre expérimentation. Toutefois, ignorant si nous pourrions, du fait des événements actuels, poursuivre l'étude que nous avons entreprise, nous avons cru devoir faire part, dès maintenant, des résultats obtenus, car en conduisant à admettre que la mononucléose infectieuse est bien une maladie spécifique transmissible, ils permettront peut-être d'orienter les recherches.

Le Gérant : G. MASSON.